

POTENSI *Bifidobacterium sp* SEBAGAI PROBIOTIK PADA EKSPRESI IL-1 β (*Interleukin-1 β*) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGIS ILLEUM MENCIT (*Mus musculus*) MODEL DEPRESI YANG DIINDUKSI KORTIKOSTERON

SKRIPSI

Oleh:
RAFI NABIL HANIFI
165130100111037



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**

POTENSI *Bifidobacterium sp* SEBAGAI PROBIOTIK PADA EKSPRESI IL-1 β (*Interleukin-1 β*) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGIS ILEUM MENCIT (*Mus musculus*) MODEL DEPRESI YANG DIINDUKSI KORTIKOSTERON

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

RAFI NABIL HANIFI

165130100111037



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Potensi *Bifidobacterium sp* Sebagai Probiotik pada Ekspresi IL-1 β (*Interleukin-1 β*) dan Gambaran Histopatologis Ileum Mencit (*Mus musculus*) Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron

Oleh :
RAFI NABIL HANIFI
165130100111037

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 29 Juni 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Wibi Riawan, S.Si, M.Biomed
NIP. 197701312005011001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya



Drh. Dyah Ayu Oktavanie, M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rafi Nabil Hanifi

NIM : 165130100111037

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Potensi *Bifidobacterium sp* Sebagai Probiotik pada Ekspresi IL-1 β (*Interleukin-1 β*) dan Gambaran Histopatologis Ileum Mencit (*Mus musculus*) Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, November 2020
Yang menyatakan,

(Rafi Nabil Hanifi)
NIM. 165130100111037

Potensi *Bifidobacterium sp* Sebagai Probiotik pada Ekspresi IL-1 β (*Interleukin-1 β*) dan Gambaran Histopatologis Ileum Mencit (*Mus musculus*) Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron

ABSTRAK

Depresi merupakan terganggunya *mood* yang dapat diakibatkan stres yang berlebihan atau dalam jangka waktu yang lama. Depresi dapat mengganggu aktivitas sehari-hari dan tidak hanya terjadi pada manusia saja. Kesehatan tubuh terutama pada organ pencernaan akan terganggu pada individu yang mengalami depresi. Probiotik *Bifidobacterium sp* yang diberikan secara oral dapat mengurangi dampak dari kerusakan pada organ pencernaan akibat depresi dengan menjaga keseimbangan mikrobiota usus dan memperkuat *barrier* mukosa usus. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mempelajari pengaruh pemberian probiotik *Bifidobacterium sp* sebagai upaya preventif depresi berdasarkan ekspresi IL-1 β dan gambaran histopatologi ileum mencit model depresi yang diinduksi kortikosteron. Sebanyak 20 ekor mencit strain DDY dibagi menjadi 4 kelompok dengan tiap kelompok terdapat 5 ulangan, dan masing-masing ulangan terdapat 5 ekor mencit. Kelompok 1) kontrol negatif, kelompok 2) kortikosteron + fluoxetine, kelompok 3) kortikosteron + probiotik *Bifidobacterium sp*, kelompok 4) probiotik *Bifidobacterium sp* dan kortikosteron + probiotik *Bifidobacterium sp*. Probiotik *Bifidobacterium sp* diberikan secara oral dengan dosis 30 mg / kgBB. Kortikosteron diberikan secara subkutan dengan dosis 20 mg / kgBB. Nekropsis dilakukan untuk mengoleksi organ ileum yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung organ. Organ ileum tersebut akan dilakukan imunohistokimia dan ileum melalui gambaran histopatologi. Data jumlah ekspresi IL-1 β dianalisa menggunakan *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *tukey*, dan gambaran histopatologi organ ileum dibaca dengan skoring terhadap perubahan permukaan epitel ileum dan dianalisa menggunakan *One Way Anova*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian probiotik *Bifidobacterium sp* dapat memperbaiki mukosa ileum dan menurunkan ekspresi IL-1 β pada ileum mencit. Hal ini ditunjukkan pada hasil penelitian, dimana gambaran histopatologi terhadap kerusakan epitel ileum dan ekspresi IL-1 β pada setiap kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna saat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Kata Kunci : Mencit strain DDY, Kortikosteron, Probiotik *Bifidobacterium sp*, Histopatologi ileum, Ekspresi IL-1 β

Potential of *Bifidobacterium sp* as a Probiotic on Expression of IL-1 β (*Interleukin-1 β*) and Histopathological Image of Mice Ileum (*Mus musculus*) as Depression Model that is Induced Corticosterone

ABSTRACT

Depression is a mood disturbance that can result from excessive stress or over a long period of time. Depression can interfere with daily activities and not only in humans. Body health, especially in the digestive organs will be disturbed in individuals who experience depression. Probiotic *Bifidobacterium sp* given orally can reduce the impact of damage to the digestive organs due to depression by maintaining the balance of the intestinal microflora and strengthening the intestinal mucosal barrier. The purpose of this study was to study the effect of the probiotic *Bifidobacterium sp* as a preventive measure for depression based on IL-1 β expression and histopathological features of corticosterone-induced depression in mice. A total of 20 DDY strain mice were divided into 4 groups with 5 replications for each group, and 5 mice for each replication. Group 1) negative control, group 2) corticosterone + fluoxetine, group 3) corticosterone + probiotic *Bifidobacterium sp*, group 4) probiotic *Bifidobacterium sp* and corticosterone + probiotic *Bifidobacterium sp*. Group 4 as a preventive group. Probiotic *Bifidobacterium sp* is given orally at a dose of 30 mg / kgBW. Corticosterone is given subcutan at a dose of 20 mg / kgBW. Necropsy is performed to collect ileum organs which are then inserted into the organ tube. The ileum organs will be carried out immunohistochemically and ileum through the histopathological image. Data on the amount of IL-1 β expression were analyzed using One Way ANOVA followed by the Tukey test, and the histopathological image of the ileal organs was read by scoring against changes in the ileal epithelial surface and analyzed using One Way Anova. The results showed that administration of the probiotic *Bifidobacterium sp* can repair the ileum mucosa and reduce IL-1 β expression in the ileum of mice. This is shown in the results of the study, where the histopathological picture of ileum epithelial damage and IL-1 β expression in each treatment group did not show significant differences when compared to the negative control group.

Keywords: Mice DDY Strain, Corticosterone, *Bifidobacterium sp* probiotic, Histopathology Ileum, IL-1 β expression.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi *Bifidobacterium sp* Sebagai Probiotik pada Ekspresi IL-1 β (*Interleukin-1 β*) dan Gambaran Histopatologis Ileum Mencit (*Mus musculus*) Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron” dengan lancar.

Selama proses penulisan dan penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat, arahan, serta saran kepada penulis.
2. Bapak Wibi Riawan, S.Si, M.Biomed selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat, arahan, serta saran kepada penulis.
3. drh. Widi Nugroho, PhD. dan drh. Andreas Bandang Hardian, MVSc. selaku dosen penguji yang berkenan meluangkan waktunya dan memberikan masukan positif bagi skripsi ini.
4. drh. Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
5. Ketua Payung Penelitian Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc.
6. Bapak Adul Haris Fahmi dan ibu Farida Nur Aini yang selalu memberikan dukungan dan dorongan serta doanya selama ini.
7. Keluarga besar *Lamine* atas cinta, semangat, dan persahabatan yang luar biasa.
8. Bangga, Wildan, Ihza, dan Agathis sebagai kelompok penelitian ini atas segala dukungan dan kerjasamanya.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, November 2020

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
SKRIPSI	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	6
2.2 Probiotik.....	8
2.2.1 Manfaat Probiotik.....	10
2.2.2 <i>Bifidobacterium</i>	11
2.2.3 Mekanisme Kerja Probiotik Terhadap Depresi.....	12
2.3 Depresi.....	13
2.3.1 Faktor Penyebab Depresi.....	14
2.3.2 Mekanisme Hormonal.....	15
2.3.3 Pengaruh Depresi Terhadap Saluran Pencernaan.....	17
2.4 Saluran Pencernaan.....	23
2.4.1 Usus Halus.....	24
2.4.2 Histologi Usus Halus.....	26
2.5 Organ Limfoid.....	27
2.6 Kortikosteron.....	31
2.7 Fluoxetine.....	35
2.8 Sitokin Proinflamasi.....	36
2.9 Sitokin Anti-Inflamasi.....	42
2.10 Interleukin-1 β	44
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	49
3.1. Kerangka Konseptual.....	49
3.2. Hipotesis Penelitian.....	53
BAB 4 METODE PENELITIAN	54
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	54
4.2. Alat dan Bahan Penelitian.....	54
4.3. Sampel Penelitian.....	54

4.4. Rancangan Penelitian.....	55
4.5. Variabel Penelitian	56
4.6. Tahapan Penelitian	57
4.7. Prosedur Kerja	59
4.7.1. Persiapan Hewan Coba	59
4.7.2. Persiapan <i>Bifidobacterium sp</i> sebagai Probiotik	60
4.7.3. Persiapan Pemberian Kortikosteron	60
4.7.4. Nekropsi Mencit	61
4.7.5. Pembuatan Preparat Histologi	61
4.7.6. Pengamatan Preparat Histopatologi	61
4.7.7. Pembuatan Imunohistokimia	62
4.7.8. Analisa Data	63
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	65
5.1. Hasil Penelitian Pengaruh Pemberian Probiotik <i>Bifidobacterium sp</i> Terhadap Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron	65
5.1.1. Pengaruh Pemberian Probiotik <i>Bifidobacterium sp</i> Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron	65
5.1.2. Pengaruh Pemberian Probiotik <i>Bifidobacterium sp</i> Terhadap Ekspresi IL-1 β pada Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron	72
5.2. Pembahasan Pengaruh Pemberian Probiotik <i>Bifidobacterium sp</i> Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum dan Ekspresi IL-1 β pada Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron	76
BAB 6 PENUTUP	80
6.1 Kesimpulan	80
6.2 Saran	80
DAFTAR PUSTAKA	81
LAMPIRAN	87

DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

2.1	Data biologis mencit di laboratorium (Hasaaanah, 2009).....	7
4.1	Skor Integritas Epitel Mukosa (Harahap, 2011)	63
5.1	Nilai rata-rata dan standar deviasi skor integritas epitel mukosa illeum....	68
5.2	Rata-rata Jumlah Ekspresi IL-1 β pada Ileum Mencit pada Setiap Kelompok Perlakuan.....	74



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>) (Hasaanah, 2009)	8
2.2 Pengaruh stres pada saluran pencernaan melalui jalur gut-brain axis (Clapp, et al., 2017).....	19
2.3 Interaksi antara mikrobiota usus dengan sistem kekebalan tubuh (Hasibuan dan Kolondam, 2017).....	22
2.4 Hubungan Sitokin Proinflamasi dengan HPA Axis (Rosyanti dan Hadi, 2018).....	48
3.1 Kerangka Konseptual	49
5.1 Histopatologi ileum mencit	66
5.2 Diagram batang rata-rata dan standar deviasi skoring integritas mukosa ileum mencit model depresi	68
5.3 Skor 0 : Epitel mukosa ileum mencit normal (400x)	70
5.4 Skor 1 : Deskuamasi Epitel Mukosa Ileum yang Ditunjukkan oleh Anak Panah (400x).....	70
5.5 Skor 2 : Erosi Epitel Mukosa Ileum yang Ditunjukkan oleh Anak Panah (400x)	71
5.6 Skor 3: Ulserasi Epitel Mukosa Ileum yang Ditunjukkan oleh Anak Panah (400x)	71
5.7 Ekspresi IL-1 β pada epitel organ ileum mencit dengan metode imunohistokimia pada perbesaran 400x.....	73
5.8 Diagram batang rata-rata dan standar deviasi ekspresi IL-1 β pada ileum mencit model depresi	75

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	88
2 Penghitungan Dosis Pemberian Kortikosteroid dan Bifidobacterium sp per-ekor mencit.....	91
3 Proses Pembuatan Preparat Histopatologi.....	92
4 Surat Keterangan Laik Etik	95
5. Hasil Statistika Preparat Histopatologi	96
6 Hasil Statistika Immunohistokimia.....	99
7 Dokumentasi Penelitian.....	102
8 Hasil Pengamatan Skor Integritas Epitel Mukosa Ileum Berdasarkan Modifikasi Kriteria Barthel Manja.....	105

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/singkatan

Keterangan

°	: Derajat
%	: Prosen
α	: Alfa
ACTH	: <i>Adrenocorticotrophic Hormone</i>
β	: Beta
BAL	: Bakteri Asam Laktat
BBB	: <i>Blood-Brain-Barrier</i>
BDNF	: <i>brain-derived neurothrophic factor</i>
C	: Celcius
Cm	: Centimeter
COX-2	: Cyclooxygenase-2
CRF	: <i>Corticotropin Releasing Factor</i>
CRH	: <i>Corticotropin Releasing Hormone</i>
CRP	: <i>C-Reactive Protein</i>
DDY	: Deutschland, Denken, and Yoken
DMSO	: <i>Dimetil Sulfoksida</i>
γ	: Gamma
GR	: Glukokortikoid Reseptor
HPA	: <i>Hypothalamic Pituitary Adrenal</i>
IBD	: <i>Inflammatory bowel disease</i>
IBS	: <i>Irritable Bowel Syndrome</i>
IDO	: <i>Indolamine- 2,3-dioksigenase</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
Kg	: Kilogram
LPS	: Lipopolisakarida
MAMPs	: <i>Microbe-associated molecular patterns</i>
mg	: Miligram
mL	: Mililiter
mm	: Milimeter
NCDs	: <i>Non-Communicable Diseases</i>
NLRP3	: <i>Nucleotide-binding-oligomerization domain like receptor and pyrin domain –containing 3</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	: <i>Power of Hidrogen</i>
Sel M	: <i>Sel Microfold</i>
SGLT	: <i>Sodium-Dependent Glucose Co-Transporter</i>
SSP	: <i>Sistem Saraf Pusat</i>

SSRI
TNF- α
TLR4

: *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*
: *Tumor Necrosis Factor- α*
: *Toll-Like Receptor-4*



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesehatan jiwa atau kesehatan mental merupakan aspek yang sangat penting untuk mewujudkan kesehatan di dalam tubuh. Kesehatan mental memiliki peranan penting terhadap kesehatan tubuh. Kesehatan mental seringkali diremehkan dan tidak diketahui oleh banyak orang meskipun kesehatan mental merupakan faktor yang memiliki resiko terhadap kesehatan fisik manusia. Data menunjukkan sekitar 450 juta orang menderita gangguan mental dan perilaku di seluruh dunia. Di Indonesia sendiri jumlah pengidap depresi ada 9.162.886 kasus atau 3,7% dari populasi (Ayuningtyas, dkk., 2018). Hampir 800.000 orang bunuh diri setiap tahunnya dengan pelaku bunuh diri yang banyak ditemukan masih berusia 15-29 tahun (Sari, dkk., 2017). Dari data diatas, terlihat bahwa depresi sangat berbahaya jika tidak segera diobati. Data menunjukkan bahwa sekitar 85% orang dengan gangguan mental parah di negara berkembang tidak mendapatkan pengobatan atas gangguan mentalnya (Ayuningtyas, dkk., 2018). Di negara yang kurang berkembang, pengobatan depresi tidak dapat dijangkau oleh semua pihak dikarenakan ekonomi yang kurang mampu (Sugiyanto, 2011).

Depresi atau gangguan kejiwaan tidak hanya terjadi pada manusia saja. Hewan juga dapat mengalami depresi, yang sebenarnya dapat dicegah, dikurangi atau diobati. Hewan dapat mengalami depresi karena berbagai faktor seperti faktor lingkungan, biologis, dan fisik atau kesehatan. Depresi sendiri

merupakan perasaan tertekan yang dapat mengganggu aktifitas hewan secara normal. Depresi dalam pengertian lain merupakan satu gangguan *mood* yang ditandai dengan hilangnya perasaan kendali dan pengalaman subjektif karena penderitaan berat (Haryanto, dkk., 2015). Depresi berbeda dengan guncangan suasana perasaan dan emosi jangka pendek. Depresi dapat mengganggu aktivitas sehari-hari (Sari, dkk., 2017). Depresi dapat dipengaruhi oleh faktor psikososial yang salah satu faktor paling berpengaruh adalah karena stressor lingkungan (Haryanto, dkk., 2015).

Depresi merupakan stressor yang dapat menyebabkan *Irritable Bowel Syndrome* (IBS) selain penyakit usus, dan dapat diperparah dengan meningkatnya CRF (*corticotropin releasing factor*) yang menyebabkan imunosupresi sehingga memicu peradangan tambahan (Mudyanadzo, *et al.*, 2018). Terjadinya peradangan akan memunculkan sitokin inflamasi seperti sitokin IL-1. IL-1 berperan dalam respon inflamasi lokal maupun sistemik (Yulianto, dkk., 2017). IL-1 β diketahui memiliki peran dalam respon stres dan patofisiologi pada depresi. IL-1 β di dalam darah dan CSF akan meningkat pada pasien yang terpapar stres dan pada pasien depresi. Peningkatannya berbanding lurus dengan usia, tingkat depresinya dan lama dari depresi. (Koo and Duman, 2009). IL-1 β merupakan sitokin proinflamasi yang mengarahkan efek pleiotrofik pada berbagai sel dan memainkan peran kunci pada inflamasi akut dan kronis selain itu juga pada kelainan autoimun. IL-1 β memiliki fungsi homeostasis pada organisme normal, seperti regulasi dari makan, tidur, dan temperatur. Namun

produksi berlebihan dari IL-1 β terlibat dalam patofisiologi dari status penyakit seperti salah satunya IBD (Ren and Torres, 2009).

IBS juga dapat menyebabkan perubahan komposisi mikroba dalam GIT sehingga memberikan efek yang luas pada sistem kekebalan dan sistem enteroendokrin. Beberapa penelitian telah membuktikan tentang efek pemberian probiotik dapat mengurangi gejala dari IBS yang ditandai dengan berkurangnya penanda proinflamasi, menurunnya regulasi sel-T dan mempertahankan *intestinal barrier* (Mudyanadzo, *et al.*, 2018).

Untuk mengurangi depresi, biasanya diberikan obat antidepresan seperti Fluoxetine yang merupakan obat golongan *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor* (SSRI) dimana terdapat efek samping yang kurang baik (Ningtyas, dkk., 2018). Probiotik adalah bakteri yang hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan efek yang baik bagi tubuh. Salah satu bakteri yang mempunyai sifat sebagai probiotik adalah bakteri penghasil asam laktat seperti *Bifidobacterium*. *Bifidobacterium* terbukti dapat meningkatkan mikroflora saluran cerna pada usus serta dapat menekan pertumbuhan bakteri merugikan di dalam usus. Pemeliharaan mikroflora di dalam tubuh dapat mengurangi resiko infeksi bakteri merugikan di dalam sistem digesti sehingga menjaga mikroflora merupakan hal yang penting (Karmini, dkk., 2007).

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik *Bifidobacterium* pada mencit model depresi yang diinduksi kortikosteron dengan melihat ekspresi IL-1 β dan gambaran histopatologis ileum.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah dijelaskan di atas dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh pemberian probiotik *bifidobacterium* terhadap ekspresi IL-1 β pada ileum mencit model depresi yang diinduksi kortikosteron?
2. Bagaimana pengaruh pemberian probiotik *bifidobacterium* terhadap gambaran histopatologi ileum pada mencit model depresi yang diinduksi kortikosteron ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Mencit strain DDY berjenis kelamin jantan usia 2-3 bulan dengan berat rata-rata 35 gram. Mencit diperoleh dari Pusat Veteriner Farma Surabaya.
2. Penggunaan hewan coba telah melalui pemeriksaan oleh Komisi Etik Penelitian (KEP) UB Universitas Brawijaya.
3. Mencit dikelompokkan menjadi 4 perlakuan yang terdiri dari kontrol negatif, kontrol positif, pemberian probiotik *Bifidobacterium* sebagai upaya preventif yang dilanjutkan dengan pemberian kortikosteron + probiotik *Bifidobacterium* dan pemberian kortikosteron yang dilanjutkan dengan pemberian probiotik *Bifidobacterium* sebagai upaya penyembuhan.

4. Dosis induksi kortikosteron dengan dosis 20 mg/kg berat badan yang diberikan secara injeksi subkutan selama 21 hari.
5. Pemberian probiotik *Bifidobacterium* dengan dosis 30 mg/kg berat badan melalui per-oral pada mencit kelompok tiga dan empat selama 14 hari
6. Variabel penelitian adalah ekspresi IL-1 β dan histopatologi organ ileum.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan diatas, penelitian ini memiliki tujuan sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh pemberian probiotik *Bifidobacterium* pada mencit model depresi yang diinduksi kortikosteron terhadap ekspresi IL-1 β
2. Mengetahui pengaruh pemberian probiotik *Bifidobacterium* terhadap gambaran histopatologis organ ileum pada mencit model depresi yang diinduksi kortikosteron.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh pemberian probiotik *bifidobacterium* sebagai upaya preventif untuk mengurangi dampak stres melalui pemeliharaan mikroflora baik pada saluran pencernaan. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi dalam penelitian selanjutnya mengenai penggunaan probiotik *bifidobacterium* terhadap peningkatan sistem imun.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit merupakan hewan pengerat yang termasuk dalam genus *Mus*.

Mencit dapat digunakan sebagai hewan coba didalam sebuah penelitian biomedis. Mencit merupakan hewan mamalia, sehingga struktur jantungnya terdiri dari empat ruang yaitu dua atrium dengan dinding yang tipis dan dua ventrikel dengan dinding yang tebal (Fidzaro, 2010). Berikut merupakan sistem

taksonomi mencit (Rostika, 2012) :

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Subfilum : Vertebrata
 Kelas : Mamalia
 Subkelas : Theria
 Ordo : Rodensia
 Suborder : Sciurognathi
 Famili : Muridae
 Subfamili : Murinae

Genus : *Mus*
 Spesies : *Mus musculus*

Mencit sering digunakan untuk penelitian biomedis manusia maupun hewan mamalia lain, meskipun anatomi dan bentuk fisiknya berbeda, tetapi mencit memiliki sistem metabolisme yang mirip dengan manusia. Beberapa alasan seorang peneliti memilih mencit sebagai hewan coba dikarenakan

biayanya lebih murah dan mudah berkembang biak (Fidzaro, 2010). Alasan lain sering digunakannya mencit sebagai hewan coba di dalam suatu penelitian adalah siklus estrusnya teratur yaitu 4-5 hari dan mudah dideteksi, selain itu lama kehamilannya relatif pendek, dan anak yang dihasilkan cukup banyak sekitar 6-15 anak dengan berat lahir berkisar 0,5-1,5 gram (Fathiya, 2018).

Tabel 2.1 Data biologis mencit di laboratorium (Hasaaanah, 2009)

Kategori	Jumlah / Waktu Normal
Berat lahir	0,5-0,1 gram
Berat dewasa	20-40 gram (Jantan) 18-35 gram (Betina)
Umur sapih	21 hari
Umur dewasa	35 hari
Umur dikawinkan	8 minggu (jantan dan betina)
Lama hidup	1-2 tahun, dan bisa sampai 3 tahun
Lama bunting	19-21 hari
Suhu (rektal)	36-39 °C (rata-rata 37,9 °C)
Jumlah anak	6-15 anak (rata-rata 6)
Kecepatan tumbuh	1 gram / hari
Volume darah	75-80 ml/kg
Sel darah merah	$7,7-12,5 \times 10^3/\text{mm}^3$
Sel darah putih	$6,0-12,6 \times 10^3/\text{mm}^3$
Hb	$13-16 \times 10^3/\text{mm}^3$
Trombosit	$150-400 \times 10^3/\text{mm}^3$

Saat ini mencit memiliki banyak strain yang dapat digunakan sebagai hewan coba, salah satunya adalah strain DDY (Deutschland, Denken, and Yoken). Mencit DDY pertamakali diperkenalkan di Jerman pada tahun 1910.

Mencit DDY memiliki keunggulan daripada mencit strain lain terutama pada aspek reproduksi dan pertumbuhan yang lebih cepat dari mencit pada umumnya (Yamazaki, *et al*, 2012).



Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*) (Hasaaanah, 2009)

2.2 Probiotik

Pada tahun 1965, istilah probiotik baru pertama kali dikenalkan oleh Lilley dan Stillwell. Mereka mendefinisikan probiotik sebagai mikroba yang dapat merangsang pertumbuhan mikroba lainnya (Ganesha dan Wibawa, 2016). Istilah probiotik diambil dari bahasa Yunani yang memiliki arti “untuk hidup”. Beberapa tahun kemudian, definisi dari probiotik diperbaiki oleh Parker (1974) yang menjelaskan bahwa probiotik adalah organisme atau substansi yang berkontribusi terhadap keseimbangan mikroba usus. Pada tahun 1989, Fuller memperbaiki lagi definisi probiotik menjadi sebuah suplemen makanan dari mikroba hidup yang memiliki efek menguntungkan bagi inang yang mengonsumsi melalui keseimbangan mikroba usus (Sunaryanto, dkk., 2014). *World Health Organization* dan *Food and Agriculture Organization* mendefinisikan probiotik sebagai mikroorganisme hidup yang ada di dalam

tubuh inang dengan jumlah yang memadai dan akan memberikan manfaat kesehatan pada inangnya (Ganesha dan Wibawa, 2016).

Probiotik merupakan mikroorganisme hidup dimana telah dimanfaatkan sebagai suplemen pengobatan atau pengobatan alternatif untuk kecemasan dan depresi (Clapp, *et al.*, 2017). Probiotik memiliki mekanisme kerja dengan cara meningkatkan keseimbangan mikroba usus sehingga kesehatan tubuh meningkat. Bakteri yang dapat digunakan sebagai probiotik adalah bakteri yang telah yang dapat bertahan lama dan dapat bermetabolisme di dalam usus halus, memberikan efek yang menguntungkan bagi inang yang mengonsumsi, mampu menempel di epitel usus halus, dapat membentuk kolonisasi, memberikan efek menguntungkan bagi mikroflora usus halus, tahan dan tetap hidup dalam proses pengolahan, mudah diaplikasikan pada produk makanan, tahan terhadap proses psikokimia pada makanan, tidak meningkatkan keasaman saat proses penyimpanan, tahan terhadap asam lambung dan empedu, dapat menghasilkan bakteriosin (substansi anti mikroba) untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen, tidak patogenik, serta aman untuk dikonsumsi (Widyaningsih, 2011). Beberapa syarat lain probiotik yang efektif adalah tidak toksik, tetap hidup dalam proses penyimpanan, mengandung sebagian besar sel hidup, memiliki sifat sensori yang baik. Bakteri probiotik yang sering digunakan pada umumnya merupakan Bakteri Asam Laktat (BAL) dan bakteri genus bacillus (Manin, dkk., 2012). Strain bakteri yang sering digunakan dan beredar di pasaran adalah bakteri dari spesies *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Ganesha dan Wibawa, 2016).

2.2.1 Manfaat Probiotik

Probiotik memiliki berbagai manfaat di dalam tubuh. Probiotik dapat mempengaruhi kesehatan mulai dari kesehatan saluran pencernaan, saluran urinasi, jantung, meningkatkan imunitas, sistem peredaran darah, mengurangi tekanan darah, menormalkan kadar kolesterol, produksi vitamin B, menyeimbangkan hormonal, mencegah infeksi parasit, dan meningkatkan kesehatan mental atau jiwa (Yakoob and Pradeep, 2019).

Bakteri *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* memiliki fungsi serta peran yang berbeda pada saluran pencernaan dikarenakan kemampuan menghasilkan produk antimikroba (bakteriosin) yang dihasilkan dari bakteri tersebut berbeda sehingga masing-masing memiliki kekurangan dan keunggulannya. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa mengonsumsi probiotik secara rutin dapat meningkatkan kekebalan tubuh terutama meningkatkan imunitas nonspesifik. (Sunaryanto, dkk., 2014). Penelitian lain membuktikan bahwa probiotik dapat mempengaruhi perubahan sistem imun didalam saluran pencernaan maupun sistemik, selain itu bakteri genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* dapat memodifikasi reaksi yang berhubungan dengan inflamasi (Widyaningsih, 2011). Manfaat penggunaan probiotik dalam pengobatan depresi dibuktikan oleh berbagai studi, yaitu dapat menormalkan kadar kortisol, meregulasi HPA axis, mengurangi beredarnya sitokin proinflamasi, dan meningkatkan integritas barier usus pada pasien *inflammatory bowel disease* (IBD) (Clapp *et al.*, 2017).

2.2.2 *Bifidobacterium*

Bifidobacterium merupakan bakteri asam laktat yang memiliki 45 spesies dan berasal dari filum *Actinobacteria*. Beberapa spesies yang sering ditemukan dan diisolasi yaitu *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium longum*, dan *Bifidobacterium infant* (Picard, *et al.*, 2015). Mereka merupakan mikroflora di dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan. Bakteri ini dapat merubah karbohidrat menjadi asam laktat dan asam asetat tanpa menghasilkan karbon dioksida dalam prosesnya. *Bifidobacterium* merupakan bakteri yang dapat menghasilkan asam format, asam asetat, asam laktat dari hasil fermentasi gula. Asam asetat yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri Gram-negatif (Sunaryanto, dkk., 2014). *Bifidobacteria* dapat diisolasi dari feses bayi yang masih disapih, air susu, air susu sapi, dan beberapa makanan yang berasal dari susu seperti keju, yogurt, dan es krim. Bakteri ini dominan berada di dalam saluran pencernaan dari bayi yang masih dalam masa sapih (Yakoob and Pradeep, 2019).

Beberapa keuntungan yang diberikan *Bifidobacterium sp* pada kesehatan adalah dapat mengurangi resiko terjadinya kanker dengan meningkatkan aktifitas antikarsinogenik, mengurangi kadar kolesterol dalam serum, meningkatkan respon imunitas tubuh dan menghambat enzim yang berbahaya (Huda, dkk., 2019). Beberapa keuntungan lain

yang diberikan oleh *Bifidobacterium* yaitu dapat mengobati berbagai penyakit perut atau *gastrointestinal*, memproduksi berbagai vitamin B (B1, B7, B11, dan B12), meringankan intoleran terhadap laktosa, mencegah dan mengobati *Inflammatory Bowel Disease*, mencegah diare akut, dan mencegah *colorectal cancer* (Yakoob and Pradeep, 2019). *Bifidobacterium* juga dapat menghambat bakteri seperti *E. Coli*, *Salmonella*, dan *Clostridium*. *Bifidobacterium* dapat meningkatkan produksi sitokin pada individu yang sehat (Widyaningsih, 2011).

2.2.3 Mekanisme Kerja Probiotik Terhadap Depresi

Saat terjadinya depresi, tubuh akan mengalami efek immunosupresan yang mengakibatkan sistem imun ditekan, sehingga dapat meningkatkan resiko terjadinya infeksi suatu antigen. Pemeliharaan mikroflora di dalam tubuh dapat mengurangi resiko infeksi bakteri merugikan di dalam sistem digesti melalui cara yaitu meningkatkan mikroflora baik di saluran cerna pada usus serta sehingga menekan pertumbuhan bakteri merugikan di dalam usus. Menjaga keseimbangan mikroflora yang di dominasi oleh bakteri probiotik di dalam saluran pencernaan dapat menjadi hal yang penting (Karmini, dkk., 2007).

Terjadinya depresi dapat menyebabkan terjadinya inflamasi pada saluran pencernaan. Pada berbagai studi, pemberian probiotik pada pasien yang mengalami inflamasi kronis memberikan efek yang positif dibuktikan dengan menurunnya produksi $\text{TNF-}\alpha$, dan pada pasien IBD dapat menekan jumlah sitokin proinflamasi serta meningkatkan integritas

barier usus. Hal itu dapat mengurangi diferensiasi dari sel T CD4⁺ menjadi sel TH2, dan menghambat *nuclear factor kappa B* (NFKB) yang mana keduanya terlibat pada proses inflamasi (Clapp, *et al.*, 2017).

2.3 Depresi

Definisi dari depresi menurut Tasmil (2012) adalah gangguan mental yang serius dan ditandai dengan perasaan sedih dan cemas. Depresi sendiri dapat terjadi dalam beberapa hari lalu menghilang tetapi ada yang sampai berkelanjutan dan dapat mengganggu aktifitas sehari-hari. Definisi lain dari depresi yaitu suatu kondisi seseorang dimana muncul perasaan kecewa saat mengalami suatu perubahan, sedih, kehilangan, kegagalan dan menjadi patologis ketika tidak dapat beradaptasi. Keadaan ini dapat mempengaruhi individu secara afektif, fisiologis, kognitif dan perilaku (Rosyanti dan Hadi, 2018). Depresi merupakan satu masa terganggunya fungsi tubuh yang berkaitan dengan perasaan yang tertekan dan gejala penyertanya, termasuk perubahan nafsu makan, psikomotor, kelelahan, rasa sakit, dan tidak berdaya (Haryanto, dkk., 2015). Depresi berbeda dengan guncangan suasana perasaan dan emosi jangka pendek yang sering timbul setiap hari, dan jika bertahan dalam waktu yang lama dengan intensitas sedang hingga berat akan menyebabkan masalah kesehatan yang serius (Sari, dkk., 2017). Depresi sendiri dapat menyebabkan terjadinya inflamasi kronis *low-grade*. Depresi sendiri dapat dimasukkan sebagai *non-communicable diseases* (NCDs) (De Punder and Leo, 2015).

2.3.1 Faktor Penyebab Depresi

Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan terjadinya depresi yaitu faktor biologis, gangguan *neurotransmitter*, faktor neuroendokrin, dan abnormalitas otak (Tasmil, 2012). Faktor lain yang dapat menyebabkan terjadinya depresi yaitu faktor genetik, faktor psikososial, faktor kepribadian, faktor kegagalan yang berulang, faktor usia, dan faktor usia. Faktor genetik menjelaskan bahwa depresi dapat diturunkan kepada anak. Disebutkan bahwa pengaruhnya genetik terhadap depresi tidak disebutkan secara khusus, hanya disebutkan bahwa setiap generasinya dari pengidap depresi memiliki kemungkinan yang lebih tinggi menderita depresi karena terdapat penurunan dalam ketahanan dan kemampuan dalam menanggapi stres. Faktor psikososial yang menyebabkan terjadinya depresi menurut Freud dalam teori psikodinamikanya disebabkan karena kehilangan objek yang dicintai. Faktor kognitif menjelaskan terjadinya depresi dikarenakan adanya interpretasi yang keliru terhadap sesuatu sehingga terjadi distorsi pikiran menjadi negatif tentang pengalaman hidup, penilaian diri yang negatif, pesimisme, dan keputusan (Haryanto, dkk., 2015). Faktor genetik dan lingkungan memiliki keterlibatan dalam penyebab terjadinya depresi serta pengobatan depresi, sehingga depresi dapat difahami sebagai hasil dari stres kehidupan yang berinteraksi dengan kerentanan genetik dan kepribadian yang diwariskan yang dapat menghasilkan disfungsi psikologis (Wahyuni, 2018).

Faktor yang memiliki dampak terbesar pada perkembangan perilaku dan respon hormon saat terjadinya stres adalah lingkungan awal dimana suatu individu itu hidup. Peran kepedulian ibu sangat penting karena dapat berdampak pada psikologi dan perkembangan psikologi anak itu sendiri.

Peran lingkungan awal yang buruk dapat menyebabkan terjadinya maladaptif sistem respon terhadap stres dan menyebabkan mudahnya terkena suatu penyakit, sedangkan peran ibu dalam merawat bayi dapat berdampak pada perkembangan emosional dan perkembangan kemampuan sosial pada bayinya (O'mahoni, *et al.*, 2009).

Dalam mewujudkan kesehatan jiwa atau kesehatan mental, sangat ditentukan oleh banyak faktor serta interaksi sosial, psikologis dan faktor biologis, faktor ekonomi dan faktor lingkungan. Faktor-faktor tersebut bukan hal yang sederhana untuk mewujudkan kesehatan jiwa (Ayuningtyas, dkk., 2018).

2.3.2 Mekanisme Hormonal

Depresi dapat ditimbulkan akibat stres. Stres adalah kondisi yang menunjukkan perubahan akibat merespon suatu stresor. Munculnya stres dipicu oleh hormon stres. Dalam keadaan normal hormon stres dilepaskan dalam jumlah kecil setiap harinya, tetapi pada keadaan stres kadar hormon yang dilepaskan meningkat (Haryanto, dkk., 2015). Stres dapat mempengaruhi homeostasis tubuh melalui dua jalur yaitu melalui HPA dan sistem saraf simpatis sehingga menghasilkan serangkaian adaptasi neural dan endokrin. Proses ini disebut sebagai respon stres. Respon stres

sendiri bertanggung jawab pada proses perubahan fisiologis dan metabolisme tubuh (Dharmayanti, 2012).

Ketika terjadi stres, maka *Hypothalamic Pituitary Adrenal* (HPA) axis akan aktif dan mensekresi *corticotrophin releasing factor* (CRF) dari hipotalamus, kemudian kelenjar pituitary akan terstimulasi dan mensekresi adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Oligschlaeger, *et al.*, 2019). HPA axis terdiri dari interaksi antara hipotalamus, kelenjar pituitari, dan korteks adrenal, yang merupakan bagian utama dari sistem neuroendokrin dalam mengontrol stres (Rosyanti dan Hadi, 2018).

Pelepasan ACTH akan merangsang kelenjar adrenal untuk melepaskan berbagai hormon, salah satunya hormon kortisol dan biasanya menyebabkan sintesis dari sitokin anti-inflamasi. Apabila emosional telah stabil, maka otak akan mendapat sinyal untuk menghambat pelepasan CRF dan siklus hormon-stres berulang lagi (Lisdiana, 2012). Produksi kortisol diatur melalui kompleks GR yang akan mengikat CRH dan ACTH dan membentuk siklus tertutup. Siklus tertutup tersebut menimbulkan umpan balik negatif (penghambatan) terutama pada kelenjar hipotalamus dan hipofisa dalam melepaskan CRH dan ACTH (Rosyanti dan Hadi, 2018).

Tikus yang mengaktifkan sirkuit stres akan menunjukkan perilaku kecemasan dan depresi (Clapp, *et al.*, 2017).

Stres dapat mengaktifkan sistem saraf simpatis dan HPA-axis. Pengaktifan dari kedua sistem tersebut menyebabkan peningkatan dari air, mineral, dan energi yang digunakan sebagai metabolisme tubuh. Sistem

saraf simpatis merespon secara cepat terhadap stres fisik maupun psikologis dengan merealokasikan energi menuju ke berbagai organ dengan regulasi saraf denyut jantung, melepaskan katekolamin (adrenalin dan noradrenalin) dari medulla ginjal, terlibat dalam retensi air dan natrium dari ginjal. *Uptake* dari glukosa aktif, air, dan natrium dimediasi dari aktivitas dari *sodium-dependent glucose co-transporter* (SGLTs).

SGLTs akan membuka jalur paraseluler sehingga nutrisi dan air dapat diserap secara osmosis (De Punder and Leo, 2015).

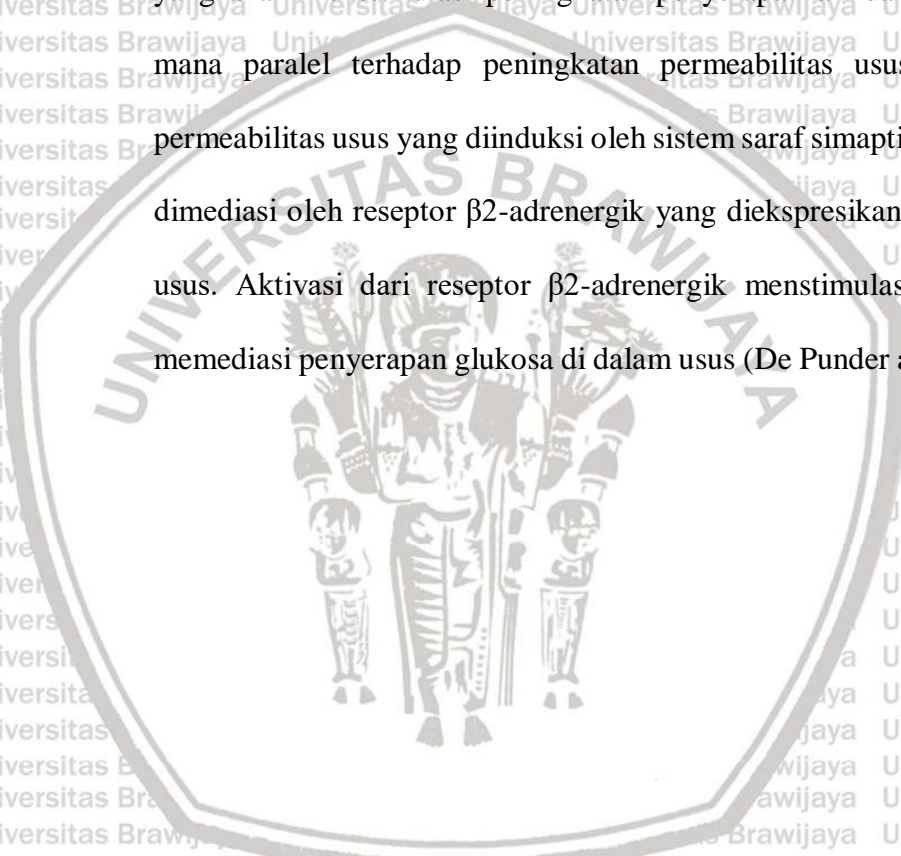
2.3.3 Pengaruh Depresi Terhadap Saluran Pencernaan

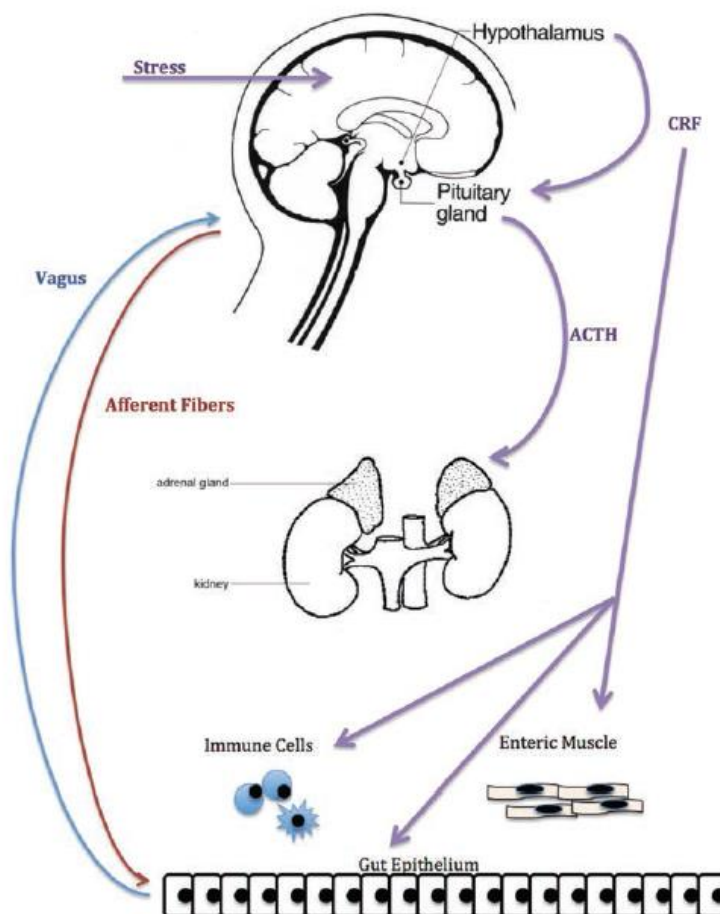
Depresi atau terjadinya stres dapat mempengaruhi fungsi dari *gastrointestinal tract* dikarenakan sistem saraf autonom mengirimkan sinyal *afferent* dari sistem saraf pusat ke dinding usus untuk menagtur respon imun dan fungsi-fungsi lain usus seperti penyerapan nutrisi. Komunikasi secara neuronal antara otak dengan saluran pencernaan dimediasi oleh serabut intestinal afferent dari nervus vagus. Stimulasi vagal oleh mikroba usus atau metabolitnya disampaikan ke nucleus tractus solitarius, dan kemudian di transmisikan ke thalamus, hipotalamus, locus coeruleus, amygdala dan periaqueductal grey (Caspani, *et al*, 2019).

Depresi dapat menyebabkan terjadinya suatu penyakit pada organ pencernaan atau yang dapat disebut dengan *Irritable bowel syndrome* (IBS). IBS merupakan suatu penyakit yang di tandai dengan rasa sakit kronis pada perut yang disertai dengan berubahnya kebiasaan buang air besar. IBS sendiri berkaitan erat dengan tekanan psikologis dan

comorbiditas psikiatrik dari suatu individu seperti kegelisahan tinggi atau pada saat terjadinya depresi yang menyebabkan kualitas hidup memburuk (Fadgyas-Stanculete, *et al.*, 2014).

Depresi sendiri diketahui dapat meningkatkan permeabilitas dari mukosa usus. Dinding usus diinervasi oleh serat saraf simpatis adrenergik yang akan menstimulasi peningkatan penyerapan air dan natrium yang mana paralel terhadap peningkatan permeabilitas usus. Peningkatan permeabilitas usus yang diinduksi oleh sistem saraf simpatis kemungkinan dimediasi oleh reseptor β 2-adrenergik yang diekspresikan pada sel epitel usus. Aktivasi dari reseptor β 2-adrenergik menstimulasi SGLT1, dan memediasi penyerapan glukosa di dalam usus (De Punder and Leo, 2015).





Gambar 2.2 Pengaruh stres pada saluran pencernaan melalui jalur gut-brain axis (Clapp, *et al.*, 2017)

Respon terhadap stres, aktivitas kortisol yang berkelanjutan juga telah dikaitkan dengan respon pro-inflamasi juga pada stres yang disebabkan karena kortisol dapat menyebabkan meningkatnya disfungsi *intestinal barrier*, dan perubahan komposisi mikroba di dalam usus (Oligschlaeger, *et al.*, 2019).

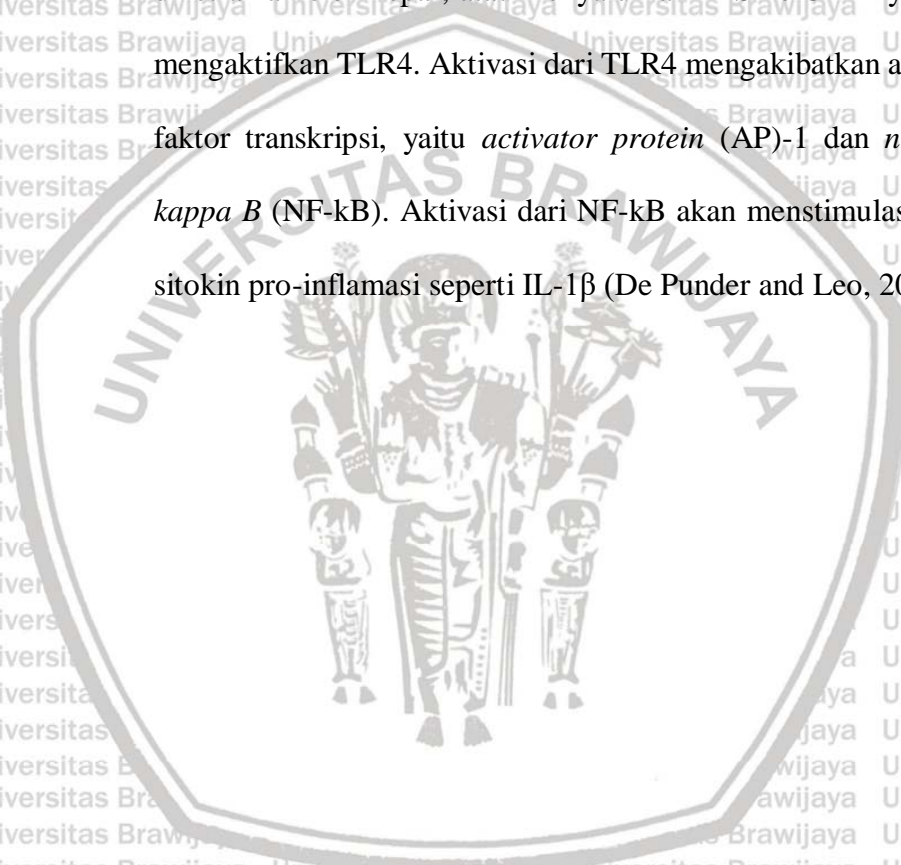
Dalam keadaan normal, mikroflora di dalam usus dalam keadaan eubiosis (status seimbang antar populasi bakteri di dalam saluran gastrointestinal) sehingga dapat menjalankan fungsi normal dalam menjaga kesehatan tubuh secara keseluruhan. Saat terjadi gangguan atau disfungsi pada keseimbangan populasi mikroflora gastrointestinal (dysbiosis), mikroflora tersebut dapat menyebabkan berbagai gangguan kesehatan.

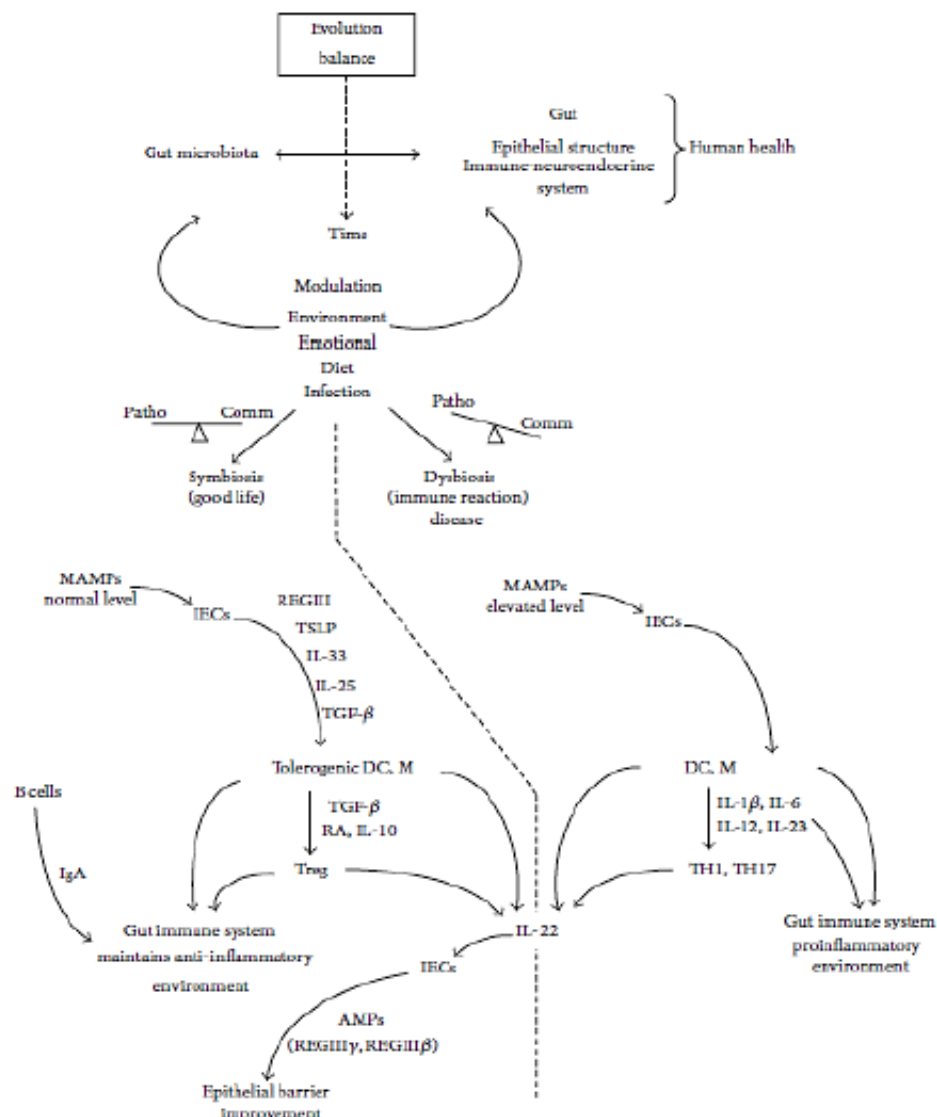
Dalam keadaan dysbiosis, bakteri patogen akan mengganggu keseimbangan bakteri komensal di dalam usus, sehingga menyebabkan pembebasan *Microbe-associated molecular patterns* (MAMPs). Peningkatan MAMPs ini dapat menginduksi sel epitel, mengaktifkan sel dendritik, dan makrofag untuk mensekresikan sitokin inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, IL-12 dan IL-23. Sitokin-sitokin ini dapat merangsang perkembangan efektor CD4⁺ sel T helper 1 (TH1) dan sel TH17 yang dapat mengakibatkan peradangan kronis. Pada saat dysbiosis juga dapat mengakibatkan mikrobiota usus menghasilkan endotoksin dalam kadar tinggi sehingga dapat menyebabkan inflamasi sistemik ringan dan berkorelasi pada berbagai penyakit seperti penyakit inflamasi pada usus (Hasibuan dan Kolondam, 2017).

Inflamasi dapat diinduksi dari ikatan *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ke *toll-like receptors* (TLRs), yang mana diekspresikan pada berbagai tipe sel imun, sel adiposa, dan sel endotel. Dari banyak studi diketahui jika PAMP adalah lipopolisakarida atau endotoksin yang mana terdapat di sirkulasi darah dalam jumlah rendah. LPS sendiri juga terdapat

di dinding sel bakteri gram negatif yang mana bakteri gram negatif banyak terdapat di dalam usus. Inflamasi dapat diinduksi dari ikatan LPS ke TLR4.

Selain itu juga LPS dapat berinteraksi dengan myeloid differential protein 2, CD14, dan LPS-binding protein (LBP). LBP akan mentranspor dan menyalurkan LPS di dalam sirkulasi menjadi lipoprotein, dan akan dinetralkan oleh hepar, atau menyalurkan LPS ke CD14 yang mana akan mengaktifkan TLR4. Aktivasi dari TLR4 mengakibatkan aktivasi dari dua faktor transkripsi, yaitu *activator protein* (AP)-1 dan *nuclear factor - kappa B* (NF- κ B). Aktivasi dari NF- κ B akan menstimulasi dari produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β (De Punder and Leo, 2015).





Gambar 2.3 Interaksi antara mikrobiota usus dengan sistem kekebalan tubuh (Hasibuan dan Kolondam, 2017).

Keadaan dysbiosis juga dapat menyebabkan permeabilitas dari usus meningkat sehingga bakteri dapat keluar dari usus, kemudian masuk ke area submukosa usus dan sirkulasi sistemik. Peningkatan permeabilitas usus memiliki efek merugikan bagi sistem imun, yang mana telah dibuktikan pada berbagai penyakit seperti *inflammatory bowel disease* (IBD), depresi, kecemasan, dan autisme (Clapp, *et al.*, 2017).

2.4 Saluran Pencernaan

Saluran pencernaan vertebrata tersusun atas rongga mulut, esofagus, lambung, usus halus, usus besar, rektum, dan anus. Saluran pencernaan dalam proses mencerna makanan dibantu oleh beberapa organ dan kelenjar seperti kelenjar air liur, hati, kelenjar empedu, dan pankreas (Costantine, 2014).

Saluran pencernaan memiliki fungsi sebagai saluran yang merubah makanan, baik secara mekanis maupun kimiawi menjadi zat-zat yang dapat diserap oleh dinding saluran pencernaan (Siagian, 2016). Zat-zat yang diserap oleh dinding saluran pencernaan diperlukan tubuh untuk imunitas, pertumbuhan, dan kebutuhan energi. Di dalam mulut terjadi proses mastikasi atau mengunyah serta proses pencernaan secara kimiawi oleh enzim ptialin (Mescher, 2013). Di dalam lambung terjadi gerak peristaltik dan proses pencernaan secara kimiawi oleh enzim dan asam klorida. Di dalam usus halus banyak terjadi penyerapan zat-zat seperti karbohidrat, lemak, dan protein yang telah dipecah menjadi molekul yang lebih kecil oleh enzim usus. Zat-zat yang diserap oleh usus halus akan diteruskan ke dalam aliran darah melalui pembuluh darah yang ada di usus halus. Di usus besar banyak terjadi penyerapan air dan elektrolit (Siagian, 2016).

Pada umumnya saluran pencernaan memiliki struktur umum tertentu. Saluran pencernaan berbentuk tabung yang berongga yang terdiri atas lumen dengan diameter yang berbeda-beda. Dinding saluran pencernaan memiliki empat lapisan utama yaitu lapisan mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Lapisan mukosa atau membran mukosa terdiri dari epitel, sebuah lamina

propria jaringan ikat yang banyak akan pembuluh darah, pembuluh limfe, limfosit, sel-sel otot polos, kadang terdapat kelenjar, dan selapis otot tipis yang disebut *muscularis mucosae* yang memisahkan lapisan mukosa dengan submukosa. Lapisan submukosa tersusun dari jaringan ikat padat yang banyak akan pembuluhdarah dan pembuluh limfe dan pleksus submukosa saraf otonom, kadang terdapat kelenjar dan jaringan limfoid. Lapisan muskularis tersusun atas sel-sel otot polos yang tersusun spiral dan terbagi dalam dua atau lebih lapisan dan diantaranya terdapat pembuluh darah. Lapisan serosa adalah lapisan tipis dari jaringan ikat longgar yang banyak akan pembuluh darah, pembuluh limfe, jaringan lemak, dan sel epitel pipih selapis sebagai epitel pelapis atau mesotelium (Mescher, 2013). Di dalam usus terdapat mikroflora yang memiliki fungsi penting seperti membantu mencerna makanan, mengatur sistem imun, dan melindungi dari bakteri patogen (Hasibuan dan Kolondam, 2017). Mikroflora pada usus memiliki peran lain yaitu untuk meregulasi depresi. Hal ini terjadi akibat aktivasi inflamasi yang dicetuskan oleh bakteri komensal non patogenik dan *derived microbe-associated molecular patterns* (MAMPs), yang akan mengalami translokasi menuju sirkulasi sirkuler perifer selama terjadi stres, selain itu terjadi peningkatan IL-1 β dan IL-18 sebagai awal patogenesis depresi dimulai (Febyan, dkk., 2019).

2.4.1 Usus Halus

Usus halus merupakan tempat akhir dari berlangsungnya proses pencernaan. Nutrisi yang masuk ke dalam usus halus akan diserap oleh sel-sel epitel dinding usus halus. Usus halus memiliki panjang yang relatif

panjang. Di dalam usus halus terdapat tonjolan mukosa atau yang biasa disebut vili. Vili tersusun dari epitel kolumnar sederhana yang absorptif atau yang disebut *enterosit*. Vili banyak dikelilingi oleh sel goblet. Usus halus juga memiliki sel imunitas alami yang terdapat pada vili yang disebut sebagai sel paneth (Mescher, 2013). Usus halus terdiri dari tiga bagian atau segmen yaitu duodenum, jejunum, dan ileum (Siagian, 2016). Pada umumnya ketiga segmen ini memiliki struktur histologis yang hampir sama. Usus halus tersusun atas empat lapisan yaitu tunika mukosa, submukosa, muskularis dan serosa. Meskipun struktur histologisnya sama, tetapi terdapat ciri-ciri yang membedakan ketiga segmen usus halus tersebut (Rostika, 2012).

ENS (*Enteric Nervous System*) merupakan sistem saraf di usus yang berhubungan dengan otak dalam mengatur kerja dari usus. ENS terhubung dua arah dengan otak yang membentuk sistem *gut-brain axis*. ENS terdiri dari reseptor dan serat aferen yang memproyeksikan ke integratif daerah pusat dan saraf eferen yang memproyeksikan ke otot polos dan kelenjar saluran pencernaan untuk langsung mempengaruhi motilitas usus, sekresi getah pencernaan dan hormon pencernaan. ENS dapat berfungsi secara independen pada SSP (sistem saraf pusat), sebuah komunikasi dua arah antara dua organ ini memungkinkan sinyal dari saluran pencernaan untuk memengaruhi otak berkaitan dengan refleksi regulasi dan suasana hati (Nikmah, 2015).

2.4.2 Histologi Usus Halus

Pada lapisan mukosa usus, permukaan usus halus terlihat memiliki lipatan-lipatan sirkular yang disebut *plicae circulares*. *Plicae circulares* paling berkembang di usus halus bagian jejunum. Usus halus dilengkapi oleh vili yang meyelubungi seluruh permukaannya. Vili dilapisi oleh sel epitel kolumnar selapis yang terdiri dari enterosit absorptif dan sel goblet. Sel goblet tersebar di antara sel absorptif. Fungsi dari sel goblet adalah sebagai penghasil mukus yang berguna untuk melumasi dan melindungi lapisan usus. Sel paneth terletak di bagian basal kriptus intestinal di bawah sel punca. Sel paneth memiliki granula sekresi yang eosinofilik berukuran besar di sitoplasma apikalnya. Ileum memiliki sel epitel khusus yang disebut dengan Sel M (*microfold*) yang menutupi folikel limfoid pada plak payer. Fungsi dari Sel M yaitu untuk mengendositoses antigen secara selektif dan mentranspornya kepada makrofag dan limfosit dan kemudian bermigrasi ke kelenjar limfoid yang merupakan tempat dimulainya respon imun terhadap antigen (Mescher, 2013). Tinggi vili usus halus memiliki ukuran yang berbeda-beda pada setiap spesiesnya dan vili pada hewan dewasa lebih tinggi daripada hewan muda. Tinggi vili juga bervariasi tergantung tempatnya (Rostika, 2012). Vili pada ileum lebih pendek daripada duodenum dan jejunum dan bentuknya mirip dengan jari. Vili berfungsi untuk memperluas permukaan usus halus sehingga penyerapan nutrisi lebih efisien. Semakin lebar vili usus, maka semakin banyak zat-zat makanan yang akan diserap oleh usus (Siagian, 2016).

2.5 Organ Limfoid

Di dalam tubuh suatu individu selain sistem peredaran darah terdapat sistem pertahanan tubuh yang disebut dengan sistem imun. Sistem imun bekerja untuk mencari dan menghancurkan bakteri, virus, jamur dan juga sel kanker. Sistem limfatik merupakan bagian dari sistem peredaran darah yang mana sebagai bagian dari sistem imun. Fungsi dari sistem limfatik yaitu membawa cairan bening atau yang disebut dengan getah bening (*lymph*).

Lymph memiliki fungsi dalam sistem imun karena memiliki fungsi yang hampir sama dengan plasma yang mana di dalamnya terdapat sel darah putih, limfosit, debris sel yang bersamaan dengan bakteri dan protein, dan juga produk buangan. Organ limfoid tersusun atas jaringan limfoid yang mana berfungsi untuk memproduksi limfosit di dalam tubuh. Beberapa organ limfoid yang diketahui ada di dalam tubuh adalah sumsum tulang, timus, kelenjar getah bening (*Lymph nodes*), limpa, dan jaringan limfoid yang ada di mukosa (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue). Sumsum tulang ditemukan terutama di bagian pinggul dan paha. Fungsi dari sumsum tulang yaitu memproduksi dari komponen darah seperti sel darah putih, sel darah merah dan platelet.

Selain itu sumsum tulang berfungsi sebagai produksi dari sel T, produksi sel B dan pematangan sel B (Al-Azab, 2017). Timus merupakan organ primer yang berfungsi dalam pematangan dan pelepasan dari sel T yang merupakan limfosit untuk sel imun adaptif. Timus dapat ditemukan di bawah tulang dada. Timus berkembang ukurannya saat individu mulai lahir dan akan mengalami regresi ketika individu memasuki masa pubertas (Miller, 2002).

Kelenjar getah bening (*Lymph nodes*) merupakan bagian dari sistem limfatik yang mana dapat ditemukan dan tersebar di berbagai bagian tubuh.

Kelenjar ini berfungsi untuk menjebak benda asing atau antigen dan menyaring agen patogen yang ditemukan di dalam tubuh. Struktur dari kelenjar ini terdiri

dari kapsul pada bagian luarnya dan di dalamnya tersusun atas korteks dan medula. Di dalam korteks bagian luar terdapat banyak terdapat sel B dan

korteks bagian dalam terdapat banyak sel T. Bagian medula dari kelenjar ini

tersusun dari plasma, makrofag dan sel B. Limpa merupakan organ yang

strukturnya hampir sama dengan kelenjar getah bening dengan ukuran yang

lebih besar dan bekerja sebagai penyaring dari darah. Limpa dapat ditemukan

di bagian atas abdomen bagian kiri. Fungsi utama dari limpa adalah untuk

memproduksi respon imun terhadap *blood-borne* antigen, untuk membuang

partikel dan sel darah yang telah rusak atau sudah tua terutama eritrosit, dan

memproduksi sel darah saat dalam masa janin. Limpa tersusun atas pulpa

merah dan pulpa putih. Pulpa putih memiliki fungsi untuk mensintesis antibodi

dan membuang antibodi yang berikatan dengan bakteri melalui sirkulasi

kelenjar getah bening. Di pulpa putih juga terdapat banyak sel T dan juga sel

B. Jaringan limfoid yang ada di mukosa berfungsi sebagai pelindung tubuh

dari berbagai macam antigen yang mana memiliki berbagai nama tergantung

pada lokasi dari jaringan tersebut. Jaringan ini terdapat berbagai tempat seperti

di usus yang disebut sebagai *peyer's patch*, bronkus, nasal, conjungtival, laring,

kulit dan vagina. Penamaan dari MALT sesuai dengan tempat dari jaringan

tersebut berada seperti *Gut-Associated Lymphoid Tissue* yang berada di usus,

Bronchus-Associated Lymphoid Tissue yang berada di bronkus, *Nasal-Associated Lymphoid Tissue* yang berada di nasal, *Conjunctival-Associated Lymphoid Tissue* yang berada di konjungtiva, *Organized Mucosa-Associated Lymphoid Tissue* yang berupa tonsil, *Diffuse Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, *Larynx-Associated Lymphoid Tissue* yang ada di laring, *Skin-Associated Lymphoid Tissue* yang berada di kulit, dan *Vulvo-Vaginal-Associated Lymphoid Tissue* yang ada di vulva dan vagina (Al-Azab, 2017).

Limfoglandula akan mengalami perubahan struktur ketika hewan mengalami infeksi. Limfoglandula terdapat menyebar di berbagai bagian tubuh dari hewan seperti pada bagian kepala, paru-paru, hati, usus, dan pada tubuh. Diketahui pada bagian kepala terdapat beberapa limfoglandula seperti limfoglandula *retrofaringealis*, tonsil, limfoglandula *paratiroideus*, limfoglandula *submaxillaris*, dan limfoglandula *mandibula*. Pada organ paru-paru terdapat limfoglandula juga seperti limfoglandula *mediastinalis cranialis* dan *caudalis* yang terletak pada bagian tengah paru-paru memanjang diantara lobus kiri dan kanan, limfoglandula *bifurcatio trachealis dextra* dan *sinistra* (limfoglandula *bronchialis*) yang terletak pada bagian kanan dan kiri bronkus, dan limfoglandula *tracheobronchialis*. Pada organ hati hanya terdapat satu nama limfoglandula yaitu limfoglandula *portalis* yang berjumlah 3-5 buah di bagian dorsal hati, dan meleka pada jaringan lemak di sekitar pembuluh darah vena porta. Pada organ usus terdapat limfoglandula yaitu limfoglandula *mesentericus* yang terletak pada lemak mesenterium sepanjang curvatura minor usus, merupakan rantai bersambung dari lambung (abomasum) hingga

caecum. Pada bagian tubuh terdapat banyak limfoglandula yaitu limfoglandula *prescapularis superior* yang terletak diantara dada, leher dan kaki depan; limfoglandula *supramamaria* yang terletak disekitar ambing hewan; limfoglandula *axillaris proprius* yang terletak di ketiak diantara kaki depan dan dada; limfoglandula *popliteus* yang terletak di atas otot *gastrocneinius*, antara otot-otot *bicep femoris* dan *seinitendonosus* yang disekitar paha bagian belakang; limfoglandula *Ischiadicus* yang terletak di daerah pinggul; limfoglandula *praescapularis* yang terletak sedikit di atas persendian pundak agak tertanam ke dalam bantalan lemak serta tertutup oleh otot *brachicepalus* dengan bentuk lonjong dan berukuran besar; limfoglandula *praefemoralis* yang terletak di atas patella atau tempurung lutut dengan bentuk lonjong memanjang serta pipih; dan limfoglandula *inguinalis superficiales* yang terletak di leher skrotum di sebelah penis, di depan cincin inguinal. Diketahui juga beberapa limfoglandula yang terdapat pada tubuh hewan yaitu limfoglandula *cervicalis superficialis*, limfoglandula *primae costae*, limfoglandula *cravialis*, limfoglandula *costocervicalis*, limfoglandula *subiliacus*, limfoglandula *iliacus lateralis* dan *medialis*, limfoglandula *ileofemoralis* dan limfoglandula *lumbales aortici* (Swacita, 2017).

Pada unggas terdapat organ limfoid primer yang berbeda dengan mamalia meskipun fungsinya mirip yaitu bursa fabrisius. Bursa fabrisius terletak pada bagian dorsal kloaka. Bursa fabrisius dikategorikan sebagai jaringan limfoid terkait usus atau *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (GALT).

Bursa fabrisius serupa dengan umbai cacing pada kelinci dan Peyer's Patch

pada domba (Ismiraj, 2020). Bursa fabrisius berfungsi sebagai tempat pendewasaan sel-sel dari sistem pembentuk antibodi (Sel B) pada unggas, karena pada unggas sumsum tulang tidak berperan dalam pembentukan sel B melainkan melalui bursa fabrisius sebagai organ GALT (Apriliyani, dkk., 2013).

Pada unggas juga terdapat jaringan limfoid pada sekum yang disebut dengan *caecal tonsil*. *Caecal tonsil* merupakan jaringan limfoid sekunder yang terletak di persimpangan sekum-rektum, adalah komponen dari jaringan limfoid terkait usus burung (GALT). Limfosit B terdapat di pusat germinal cecal tonsil (Li, *etl al.*, 2014). *Caecal tonsil* morfologinya pada unggas sama dengan peyer's patch pada burung, tonsil pada hewan mamalia, dan apendiks pada manusia (Udumoh, *et al.*, 2021).

2.6 Kortikosteron

Kortikosteron adalah glukokortikoid yang disekresikan oleh kortek adrenal pada saat terjadinya stres. Pada saat terjadinya stres, tubuh akan menghasilkan kortisol dan kortikosteron hanya saja kortikosteron lebih dominan diproduksi oleh mencit atau tikus (Oxford Biomedical Research, 2008). Pemberian nama glukokortikoid sendiri dikarenakan hormon ini dapat menambah produksi glukosa yang melibatkan sejumlah jaringan dan beberapa jalur biokimia. Glukokortikoid menambah produksi glukosa hati dengan cara meningkatkan glukoneogenesis dan melepas asam amino (Lukman, 2008).

Glukokortikoid memiliki efek yang berbeda pada semua sistem di dalam tubuh. Pada sistem imun, kelebihan akan glukokortikoid dapat menyebabkan terjadinya immunosupresi sehingga proses inflamasi juga terhambat. Pada saluran gastrointestinal, glukokortikoid memiliki efek langsung terhadap transport ion natrium di colon melalui reseptor glukokortikoid dan pada pemakaian yang lama dapat meningkatkan terjadinya resiko ulkus peptikum pada saluran cerna atas. Penggunaan glukokortikoid memiliki efek samping pada tingkah laku seperti nervous, euphoria, psikosis, dan insomnia (Aziz, 2011).

Glukokortikoid merupakan hasil akhir dari stimulasi *hipotalamus – pituitary-adrenal*, dimana glukokortikoid dapat mempengaruhi sistem imun dengan cara merubah alur leukosit dan migrasi beberapa tipe sel ke area inflamasi dan menghambat fungsi individual sel (Rosyanti dan Hadi, 2018). Hormon glukokortikoid juga menghambat *uptake* dan penggunaan glukosa oleh jaringan ekstra hepatic sehingga menyebabkan glukosa dalam plasma meningkat. Pada keadaan normal, dampak ini dilawan dengan pelepasan insulin untuk menormalkan kadar glukosa dalam darah. Peran lain dari hormon glukokortikoid yaitu berperan dalam sintesis glikogen, metabolisme lipid, dan metabolisme asam nukleat. Fungsi lain dari glukokortikoid diketahui berperan dalam pengaturan fungsi kardiovaskuler, metabolisme cairan dan elektrolit, metabolisme kalsium, pertumbuhan jaringan penyambung, otot dan tulang serta respon stres (Lukman, 2008).

Terjadinya stres akan meningkatkan sekresi dari kortikosteron, yang mana diketahui dapat merusak sel saraf dan mungkin memiliki korelasi dengan manifestasi tingkah laku dari depresi. Kortikosteron dilepaskan di pembuluh darah pada saat terjadinya stres, masuk ke otak melalui *blood-brain-barrier*, dan didistribusikan ke area otak yang berbeda-beda (Yamaguchi, *et al.*, 2018).

Kortisol yang disekresikan akan mengikat *glukokortikoid reseptor* (GR) dan membentuk kompleks GR diikuti oleh reaksi dimerisasi dari kompleks GR.

Sekresi kortisol berbanding lurus dengan perubahan mental (keadaan stres) individu dan berbanding terbalik dengan imunitas tubuh dikarenakan efek dari kortisol sendiri yaitu dapat menghambat sintesis protein T (Rosyanti dan Hadi, 2018). Dalam keadaan normal, glukokortikoid dapat membataasi aktivitas dari sistem imun, tetapi dalam keadaan stres kronis, stimulasi kronis dari HPA-axis dapat menyebabkan resistensi dari glukokortikoid pada tingkat sistem imun, sehingga membuat tidak sensitifnya penghambatan dan pengaturan dari sistem imun. Ketidaksensitifan ini menyebabkan tidak responsifnya penghambatan dari glukokortikoid terhadap pelepasan sitokin dan proliferasi sel (De Punder and Leo, 2015).

Salah satu molekul yang diproduksi secara lokal oleh sel epitel usus sebagai *imunoregulator* adalah glukokortikoid (kortisol pada manusia dan kortikosteron pada *rodent*) (Bouguen, *et al.*, 2015). Tingkat kortisol pada sumbu HPA-axis akan meningkat selama stres sehingga menyebabkan penurunan fungsi dari reseptor glukokortikoid, hal ini mengakibatkan resistensi glukokortikoid dan meningkatnya peradangan (Rosyanti dan Hadi,

2018). Glukokortikoid dosis tinggi diketahui menginduksi apoptosis pada timosit, sel T, Sel B, makrofag, sel dendrit matang dan yang belum matang (*immature*), eosinofil, dan sel NK sehingga menimbulkan *immunosupresi* pada individu tersebut (Bouguen, *et al.*, 2015).

Produk yang dihasilkan pada proses respon stres yaitu kortikostreson (pada hewan pengerat) dan katekolamin (epinefrin dan norepinefrin).

Peningkatan kortikosteron dan katekolamin akan menyebabkan perubahan metabolisme lipoprotein. Katekolamin merangsang jaringan adiposa untuk melepaskan asam lemak bebas melalui proses lipolisis dengan aktivasi saraf simpatis. Akumulasi dari asam lemak bebas pada sirkulasi darah akan memicu produksi trigliserida yang mengandung *very low density lipoprotein* (VLDL), sehingga terjadi peningkatan LDL dalam darah. Norepinefrin akan menstimulasi reseptor beta adrenergic pada jaringan adiposa yang menyebabkan penurunan proses pembersihan trigliserida dan konsentrasi HDL menurun, serta kadar LDL meningkat sehingga kadar kolesterol total dalam darah akan meningkat. Kortikosteron dapat mempengaruhi mobilisasi lemak dan metabolisme lemak melalui aktivasi sumbu HPA. Kortikosteron dan asam lemak bebas merangsang sekresi VLDL, meningkatkan sintesa trigliserida hepatic, menghambat sekresi insulin dan meningkatkan ketidakpekaan insulin pada jaringan serta peningkatan sekresi Apo-B pada hati. Proses ini dapat menyebabkan meningkatnya produksi dan sekresi VLDL oleh hati yang akan diubah menjadi LDL. LDL akan membawa kolesterol dari jaringan menuju

darah, sehingga kadar kolesterol total dalam darah meningkat (Dharmayanti, 2012).

2.7 Fluoxetine

Fluoxetine merupakan obat antidepresan yang termasuk dalam golongan obat SSRI (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) (Ningtyas, dkk., 2018).

SSRI merupakan obat yang paling sering digunakan dalam pengobatan depresi mayor. Mekanisme kerja dari obat ini yaitu dengan menghambat pengambilan

5-HT ke dalam neuron presinaptik. Obat golongan ini sering digunakan pada pengobatan dikarenakan obat ini memiliki efek samping yang relatif aman.

Fluoxetine dilaporkan dapat berinteraksi dengan 40 obat lainnya karena termasuk golongan obat SSRI yang dapat menyebabkan serotonin syndrome. (Rosyanti dan Hadi, 2018).

Fluoxetine dikatakan dapat menghambat sitokin yang muncul pada saat terjadinya depresi yaitu IL-1 β dan IL-18 yang dilihat dari penurunan kadar inflammasom NLRP3 (*Nucleotide-binding-oligomerization domain like receptor and pyrin domain –containing 3*). Inflammasom NLRP3 dapat mengaktivasi caspase 1 perifer sehingga terjadi peningkatan sitokin IL-1 β dan IL-18. Cara kerja fluoxetine dalam menurunkan inflammasom NLRP3 yaitu dengan menghambat aktivasi ROS (Febyan, dkk., 2019).

2.8 Sitokin Proinflamasi

Sitokin proinflamasi merupakan sitokin yang mana meningkatkan regulasi dari reaksi inflamasi yang terjadi di dalam tubuh. Sitokin yang merupakan kunci dari sitokin proinflamasi adalah IL-1, IL-6, dan TNF- α . Diketahui berbagai sitokin proinflamasi yang ada di dalam tubuh seperti G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), IL-1(α dan β), IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-15, IL-17, IL-19, IL-20, IL-32, IL-36, TNF (α dan β) dan IFN (α , β , γ). Selain itu diketahui juga beberapa keluarga dari IL-1 memiliki fungsi sebagai sitokin proinflamasi yaitu IL-1 α , IL-18, dan IL-33 (Dinarello, 2018).

Sitokin-sitokin tersebut terlibat dalam proses nyeri patologis. IL-1 β diketahui dilepaskan ketika terjadi kerusakan sel, infeksi, invasi, dan saat terjadinya inflamasi. Ekspresi dari IL-1 β akan meningkat ketika terjadi kerusakan di saraf perifer dan terjadinya trauma pada mikroglia dan astrosit pada sistem saraf pusat (Zhang and An, 2007). Sitokin ini disintesis pada respon terhadap stimulus inflamasi, dalam bentuk inaktifnya sitokin ini terakumulasi di sitosol. Sitokin ini berperan penting dalam sistem imun innate dengan cara memicu produksi dari sitokin proinflamasi lain pada sel targetnya dan menginisiasi pada respon inflamasi akut. IL-1 α sebagai sitokin proinflamasi yang mempengaruhi sel T-helper yang menyebabkan induksi dari sekresi IL-2 dan ekspresi dari reseptor IL-2. IL-3 diproduksi oleh sel T teraktivasi, sel mast dan eosinofil. IL-3 adalah faktor pertumbuhan hematopoietik yang merangsang pembentukan koloni eritroid, megakariosit, neutrofil, eosinofil, basofil, sel mast dan garis keturunan monositik. Sebagian besar fungsi ini ditingkatkan

atau bergantung pada stimulasi bersama dengan sitokin lain. IL-5 adalah sitokin TH2 yang bertindak sebagai faktor pertumbuhan hematopoietik yang mendorong proliferasi, aktivasi, dan diferensiasi eosinofil dari sel induk sumsum tulang. Pada tikus, IL-5 bekerja pada sel B untuk menginduksi ekspresi IL-2R (CD25) pada sel B teraktivasi, proliferasi dan sekresi IgM dan IgA dari sel B teraktivasi endotoksin (eBioscience, 2012).

IL-6 diproduksi oleh berbagai jenis sel yang meliputi monosit, fibroblas, dan sel endotel. IL-6 mempengaruhi respon imun spesifik antigen, respon inflamasi, merupakan mediator utama dari reaksi fase akut dan hematopoiesis, dan memainkan peran sentral dalam mekanisme pertahanan host. IL-6 juga terlibat dalam induksi protein fase akut dan induksi demam (eBioscience, 2012). IL-6 diketahui memiliki peran penting pada reaksi saraf ketika saraf mengalami kerusakan yang mana IL-6 berperan dalam perkembangan *neuronal pain behavior* ketika terjadi cedera pada saraf perifer (Zhang an An, 2007). IL-8 adalah anggota dari keluarga kemokin dan merupakan mediator utama dari respon inflamasi. IL-8 diinduksi oleh aktivator seperti LPS, IL-1, dan TNF untuk diproduksi/disekresikan dari berbagai jenis sel yang meliputi monosit, limfosit, granulosit, fibroblas, endotel, dan sel epitel. IL-8 berfungsi sebagai kemoatraktan yang kuat dan faktor angiogenik. Pada basofil, IL-8 merangsang pelepasan histamin. IL-8 secara selektif merangsang kemampuan neutrofil dan limfosit T untuk menginvasi jaringan yang terluka atau meradang. IL-9 adalah sitokin proinflamasi yang diidentifikasi oleh efek proliferasinya pada populasi sel T. IL-9 adalah anggota keluarga sitokin yang bergantung

pada rantai gamma reseptor sitokin umum yang juga mencakup IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 dan IL-21. IL-15 adalah sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam aktivasi neutrofil, sel dendritik, dan makrofag, dan sangat penting untuk proliferasi dan diferensiasi sel NK dan sel T CD8. Interleukin-17 (IL-17) adalah keluarga dari 6 sitokin terkait erat yang mencakup IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), dan IL-17F yang berfungsi dalam respon imun baik sebagai homodimer atau heterodimer dengan anggota keluarga lainnya. IL-17A, IL-17E, dan IL-17F adalah sitokin pro-inflamasi yang penting, sementara lebih sedikit yang diketahui tentang IL-17B, IL-17C, dan IL-17D dan fungsinya masih kurang dipahami. Salah satu prinsip fungsi IL-17 tampaknya menjadi regulasi peradangan jaringan lokal melalui ekspresi terkoordinasi dari berbagai sitokin dan kemokin yang mencakup IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, TNF, CXCL1, MCP-1, MIP-2, MCP-3, dan MIP-3 α . Setelah interaksi ligan/reseptor, IL-17A menginduksi produksi sitokin inflamasi ini dalam sel epitel, sel endotel, dan fibroblas melalui jalur keluarga NF κ B dan MAPK yang menghasilkan aktivasi banyak protein AP-1. IL-19 termasuk keluarga IL-10, yang meliputi IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, dan beberapa sitokin yang dikodekan virus. Transkripsi gen IL-19 telah terdeteksi pada monosit dalam fase istirahat dan pada tingkat yang lebih rendah dalam sel B. IL-19 menginduksi produksi IL-6 dan TNF α dalam monosit. Ini juga menginduksi apoptosis sel dan produksi spesies oksigen reaktif oleh monosit. IL-20 adalah anggota dari keluarga sitokin IL-10 yang diekspresikan oleh monosit, sel dendritik, dan keratinosit. Ikatan ligan IL-20 menginduksi

produksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF α dalam monosit dan telah terlibat dalam kondisi inflamasi seperti aterosklerosis, rheumatoid arthritis, dan psoriasis. IL-32 adalah sitokin pro-inflamasi. IL-32 diproduksi oleh sel T, sel NK teraktivasi IL-12, monosit, sel epitel teraktivasi IFN γ , dan keratinosit. Secara fungsional, IL-32 diketahui mengaktifkan jalur pensinyalan NF κ B, p38 MAPK, dan AP-1. Ini terlibat dalam generasi IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-2, dan TNF. IL-32 adalah sitokin yang menarik karena diketahui diekspresikan dalam sitosol dan inti sel. IL-33 adalah anggota keluarga IL-1. Ini adalah sitokin polarisasi TH2 pro-inflamasi yang meningkatkan respons sel TH2. IL-33 biasanya tidak diekspresikan oleh sel hematopoietik, melainkan oleh fibroblas, sel epitel, dan sel endotel. Dengan tidak adanya rangsangan pro-inflamasi, IL-33 melokalisasi ke nukleus. IL-36 adalah anggota keluarga sitokin IL-1. Setidaknya ada 4 isoform yang diketahui dari IL-36 yang meliputi IL-36Ra (IL-1F5), IL-36 α (IL-1F6), IL-36 β (IL-1F8), dan IL-36 γ (IL-1F9). Mereka diekspresikan oleh makrofag dan sel epitel, dan diekspresikan dengan kuat oleh monosit. Setelah aktivasi, mereka seperti anggota keluarga IL-1 lainnya (IL-1, IL-18, dan IL-33) yang mengarah pada aktivasi jalur NF κ B dan MAPK (eBioscience, 2012).

TNF- α adalah sitokin pleiotropik yang memainkan peran kunci dalam imunitas bawaan dan adaptif. TNF- α secara luas terlibat dalam berbagai respons dan regulasi imun, meskipun TNF α paling sering dikaitkan dengan regulasi kelangsungan hidup sel dan sifat pro-inflamasi. TNF α diketahui menginduksi proliferasi/diferensiasi sel, tumorigenesis, kematian sel apoptosis

atau nekrotik (termasuk garis sel tumor tertentu), aktivitas imunoregulasi, metabolisme lipid, koagulasi, dan fungsi endotel. Sifat pro-inflamasinya menyebabkan perekrutan dan aktivasi sel-sel inflamasi ke tempat cedera di mana ia diketahui menginduksi berbagai sitokin yang meliputi IL-1, IL-6, dan IL-8. TNF- α terutama diekspresikan oleh makrofag dan monosit, tetapi juga diekspresikan oleh neutrofil, sel NK, sel mast, sel endotel, limfosit teraktivasi, dan berbagai jenis sel spesifik jaringan termasuk kanker tertentu (eBioscience, 2012). TNF- α diketahui diaktivasi oleh NF- κ B ketika terjadi inflamasi di dalam tubuh seperti dengan IL-1 β . TNF- α dapat meregulasi terjadinya apoptosis sel. TNF- α diketahui memiliki peran penting yaitu pada saat terjadi inflamasi dan *neuropathic hyperalgesia* (Zhang and An, 2007). TNF- β diproduksi oleh limfosit teraktivasi di mana ia diinduksi dengan cara terbatas MHC antigen spesifik dari sel T terbatas kelas I dan kelas II serta oleh jaringan limfoid selama infeksi virus. Fungsi utama dari TNF- β adalah fagositosis, kemotaktik, oncosatik, dan menginduksi sitokin lain. G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) adalah anggota dari keluarga sitokin IL-6. G-CSF diproduksi oleh monosit teraktivasi, makrofag, sel endotel, fibroblas, astrosit, dan osteoblas sebagai respons terhadap infeksi dan mediator inflamasi seperti IL-1 β , IL-17, TNF, dan LPS, serta berbagai sel yang diubah seperti sel karsinoma dan sel leukemia myeloblastik. G-CSF telah terbukti memiliki efek spesifik pada proliferasi, diferensiasi, mendukung proliferasi, aktivasi, dan diferensiasi neutrofil dalam darah (eBioscience, 2012).

Interferon- α (IFN- α) merupakan sitokoin proinflamasi yang diproduksi oleh makrofag, neutrofil, dan beberapa sel somatis. Fungsi utama dari IFN- α adalah sebagai anti viral untuk melawan infeksi virus. Interferon- β (IFN- β) merupakan sitokin proinflamasi yang di lepaskan oleh fibroblast. Fungsi utama dari IFN- β adalah sebagai anti-viral untuk melawan infeksi virus dan juga sebagai anti-prolifratif. IFN γ (Interferon-gamma) adalah glikoprotein homodimerik yang diproduksi oleh sel T, B dan NK yang diaktifkan. IFN γ diproduksi selama infeksi oleh sel T sitotoksik (CD8+) dan oleh sel TH1 di mana IFN γ secara istimewa menghambat proliferasi TH2, menghasilkan proliferasi preferensial sel TH1. IFN γ berfungsi sebagai agen anti-virus dan anti-parasit dan juga bekerja secara sinergis dengan sitokin lain, seperti TNF untuk menghambat proliferasi sel normal dan sel yang bertransformasi. IFN γ menginduksi efek imunomodulator pada berbagai jenis sel yang mencakup menjadi aktivator kuat fagosit mononuklear, augmentasi endositosis dan fagositosis oleh monosit, dan aktivasi makrofag untuk membunuh sel tumor. Selain itu, ia meningkatkan proliferasi sel B yang diaktifkan dan dapat bertindak secara sinergis dengan IL-2 untuk meningkatkan sintesis rantai ringan imunoglobulin. Akhirnya, IFN γ mengaktifkan neutrofil, sel NK dan sel endotel vaskular (eBioscience, 2012).

2.9 Sitokin Anti-Inflamasi

Sitokin anti-inflamasi merupakan sitokin yang berfungsi sebagai imunoregulator yang mengontrol respon dari sitokin proinflamasi. Sitokin bekerja bersama dengan inhibitor sitokin spesifik dan reseptor sitokin terlarut untuk mengatur respon imun. Beberapa sitokin anti-inflamasi yang diketahui adalah IL-1 reseptor antagonis, IL-4, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-22, TGF- β (Zhang an An, 2007). Selain itu diketahui juga beberapa keluarga dari IL-1 memiliki fungsi sebagai sitokin anti-inflamasi seperti IL-1Ra, IL-46Ra, IL-37 dan IL-38 (Dinarello, 2018).

IL-4 adalah sitokin anti-inflamasi TH2 yang disekresikan oleh sel TH2 dan NK yang diaktifkan, dan pada tingkat yang lebih rendah oleh sel TH1 dan mast. Dalam makrofag, IL-4 dapat menghambat produksi TNF, IL-1, dan IL-6. Dengan relevansinya dengan penyakit, IL-4 adalah molekul perangsang kekebalan. IL-10 adalah sitokin TH2 anti-inflamasi yang memiliki peran penting dalam membatasi respon imun terhadap patogen untuk mencegah kerusakan pada tubuh inang. IL-10 diketahui diekspresikan oleh banyak sel imun adaptif termasuk sel TH2, TH17, TReg, dan B, serta sel imun bawaan termasuk sel dendritik (DC), makrofag, sel mast, sel natural killer (NK), eosinofil, dan neutrofil (eBioscience, 2012). IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang menekan ekspresi dari sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan IL-1, selain itu IL-10 juga dapat meningkatkan regulasi dari sitokin anti-inflamasi endogen dan menurunkan regulasi dari reseptor sitokin proinflamasi (Zhang an An, 2007).

IL-11 adalah anggota dari keluarga sitokin IL-6. Ini adalah sitokin pleiotropik yang telah terbukti memiliki efek luas pada banyak jenis sel. IL-11 diproduksi oleh berbagai jenis sel yang meliputi epitel, endotel, keratinosit, stroma, neuronal, sel stroma sumsum tulang, fibroblas, osteoklas, dan sel stroma lainnya. IL-11 juga melindungi terhadap kematian sel dan menghambat peradangan di lokasi cedera jaringan. IL-12 sitokin yang dilepaskan oleh sel NK, makrofag dan sel tumor. Keluarga sitokin Interleukin-12 (IL-12), yang meliputi IL-12, IL-23, IL-27, dan IL-35, merupakan mediator penting dari penyakit inflamasi. Sebagai penginduksi produksi IFN γ , IL-12, IL-23, dan IL-27 memainkan peran penting dalam mengatur respon inflamasi. Selain itu, masing-masing terlibat dalam memediasi imunitas yang bergantung pada sel T. Misalnya, IL-12 dan IL-27 terlibat dalam diferensiasi T helper 1 (TH1). IL-13 adalah sitokin TH2 pleiotropik yang diekspresikan oleh sel T helper teraktivasi, sel T CD8+, dan sel NK. IL-13 berfungsi untuk menekan aktivitas makrofag sitotoksik, meningkatkan ekspresi IL-1RA, dan menekan ekspresi sitokin inflamasi. IL-22 adalah sitokin yang mengatur produksi protein fase akut dari respon imunologi. IL-22 diproduksi oleh sel TH1, TH17, dan NK yang bekerja terutama pada sel epitel dan terlibat dalam respon inflamasi. IL-22 diyakini bekerja lebih banyak pada sel-sel kulit dan sel-sel sistem pencernaan dan pernapasan. IL-22 berfungsi sebagai molekul pelindung untuk melawan sifat destruktif dari respon imun untuk membatasi kerusakan jaringan dan bertindak sebagai mediator sel T yang secara langsung mempromosikan imunitas bawaan nonspesifik pada jaringan. IL-37 merupakan sitokin anti-

inflamasi yang diproduksi oleh sel B, sel NK, dan monosit. Fungsi utama dari sitokin ini dipercaya bertindak sebagai regulator negatif di dalam sel dimana dia berinteraksi dengan SMAD3 yang diaktifkan di hilir aktivitas TGF- β . IL-38 merupakan sitokin yang dilepaskan oleh sel B dan makrofag. Meskipun sedikit yang saat ini diketahui tentang IL-38 (IL-1F10), IL-38 telah terbukti diekspresikan dalam sel B yang berproliferasi di pusat germinal tonsil dan epitel basal kulit dan IL-38 berikatan dengan reseptor IL-1 tipe I yang larut. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) bertindak sebagai anti-inflamatori, dimana TGF- β diproduksi oleh sel-T dan sel B. Fungsi utama dari TGF- β adalah menghambat proliferasi dari sel-T dan sel B, menghambat hematopoiesis, dan mendorong penyembuhan luka (eBioscience, 2012). TGF- β diketahui menekan produksi sitokin dengan cara menghambat aktivitas dari makrofag dan sel Th1, selain itu menginduksi IL-1Ra6 dan berperan sebagai antagonis dari sitokin proinflamasi (Zhang and An, 2007).

2.10. Interleukin-1 β

Dari studi biologi molekuler, diketahui terdapat berbagai peran sitokin proinflamasi saat terjadi inflamasi, salah satunya adalah sitokin Interleukin-1 (IL-1). Interleukin-1 adalah sitokin yang memiliki berbagai fungsi dengan aktivitasnya yang luas pada berbagai jaringan dan merupakan mediator sel imun yang berfungsi dalam pengaturan resorpsi dan formasi tulang serta sintesis prostaglandin di dalam tulang. Interleukin 1 juga dapat berfungsi sebagai

mediator dari respon tubuh terhadap cedera jaringan, reaksi immunologis, dan invasi mikroba (Kusumadewy, 2012).

Sitokin adalah reseptor kimia antara sel-sel kekebalan tubuh yang terdiri dari kelompok molekul heterogen pembawa pesan. Sitokin diproduksi oleh sel-sel imunokompeten, seperti sel limfosit dan makrofag. Sitokin disintesis oleh sel-sel imun dalam darah, jaringan perifer, dan sel-sel glia di dalam sistem saraf pusat (SSP). *Blood-brain barrier* (BBB) permeabel terhadap sitokin dan sel-sel imun. Saraf aferen, seperti saraf vagus dapat memediasi komunikasi antara proses inflamasi perifer dan SSP (Rosyanti dan Hadi, 2018).

Interleukin adalah molekul yang memediasi komunikasi antar leukosit. IL-1 memiliki fungsi yang sama dengan *Tumor Necrosing Factor- α* (TNF- α), yang berperan sebagai mediator inflamasi terhadap infeksi dan stimulus lainnya. IL-1 berperan dalam respon inflamasi lokal maupun sistemik. IL-1 dan TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang bekerjasama pada saat fase awal penyembuhan luka (Yulianto, dkk., 2017). IL-1 juga dapat menjadi biomarker stres dari kelompok fungsi imun selain *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), IL-6, IL-10, IL-12, dan *C-Reactive Protein* (CRP). Pada saat terjadinya stres kronis, imunitas humoral akan terpengaruh dan dapat dilihat dari produksi sitokin. Pelepasan IL-1 dilepaskan karena distimulasi stres dan dapat memicu produk IL-6. Pelepasan sitokin IL-1 dan IL-6 serta TNF- α dapat menyebabkan gangguan pada tubuh seperti menekan nafsu makan dan meningkatkan resistensi insulin. IL-1 memiliki dua isoform aktif yaitu α dan β . *Interleukin 1- β* merupakan mediator utama dari respon inflamasi (Harsas, 2014). IL-1 β dapat

meningkat produksinya jika terjadi stres mekanik (Kusumadewy, 2012).

Prekursor IL-1 β yang tidak aktif terakumulasi dalam sitosol sampai diproses oleh aktivasi NLRP3 dan caspase-1 untuk menjadi sitokin aktif. Setelah stimulasi LPS pada monosit, kadar mRNA IL-1 β meningkat dengan cepat dalam waktu 15 menit, mencapai kadar puncak pada 4 jam tetapi mulai menurun. Pembelahan prekursor IL-1 β oleh caspase-1 aktif dapat terjadi di lisosom sekretori khusus atau di sitoplasma (Dinarello, 2018).

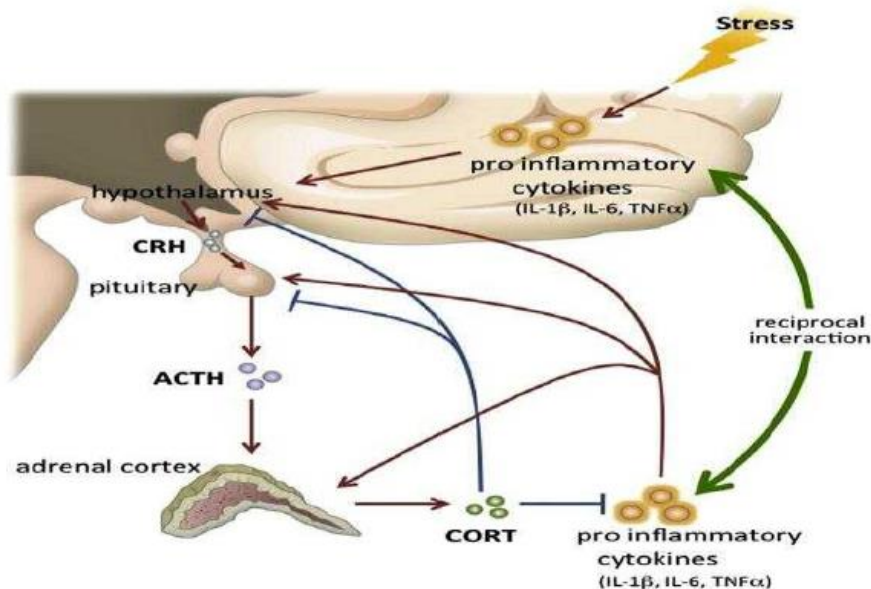
IL-1 β pada sistem seluler diketahui ada di microglia, astrosit dan neuron. IL-1 β mengerahkan berbagai efek melalui interaksi dengan reseptor IL-1 β yang mana dilokalisasi di beberapa area di otak rodent, dengan ekspresi tertinggi di hippocampal neuron. IL-1 β diketahui memiliki peran dalam respon stres dan patofisiologi pada depresi. IL-1 β di dalam darah dan CSF akan meningkat pada pasien yang terpapar stres dan pada pasien depresi. Peningkatannya berbanding lurus dengan usia, tingkat depresinya dan lama dari depresi. (Koo and Duman, 2009). Ketika terjadi inflamasi maka IL-1 β dalam bentuk aktif akan dikeluarkan dari sel. Pengeluaran IL-1 β keluar sel memiliki berbagai jalur. Jalur-jalur yang diketahui yaitu melalui eksositosis dari sekretori lisosom, pelepasan mikrovesikel membran plasma, pelepasan langsung melalui transporter atau badan multivesikular yang mengandung eksosom, atau dari proses yang disebut piroptosis (Dinarello, 2018).

IL-1 β merupakan sitokin proinflamasi yang mengarahkan efek pleiotrofik pada berbagai sel dan memainkan peran kunci pada inflamasi akut dan kronis selain itu juga pada kelainan autoimun. IL-1 β memiliki reseptor IL-1 tipe 1 (IL-

1 RI). IL-1 β memiliki fungsi homeostasis pada organisme normal, seperti regulasi dari makan, tidur, dan temperatur. Namun produksi berlebihan dari IL-1 β terlibat dalam patofisiologi dari status penyakit seperti salah satunya IBD. IL-1 β dapat dilepaskan dari keratinosit, fibroblas, synoviosit, endothelial, neuronal, sel imun seperti makrofag dan sel mast, sel glia seperti sel schwann, mikroglia dan astrosit. (Ren and torres, 2009). IL-1 β dan berbagai sitokin proinflamasi yang dihasilkan oleh NF-kB akan menstimulasi perkembangan dari efektor sel T helper 1 CD4⁺ dan TH17 (Carlessi, *et al.*, 2019).

Pada proses awal patogenensis depresi, IL-1 β dan IL-18 akan meningkat. IL-1 β dan IL-18 akan menginduksi p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), sehingga *re-uptake* serotonin akan meningkat dan menyebabkan penurunan dari kadar serotonin sinaptik (Febyan, dkk., 2019). Sitokin seperti IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), dan interferon-gamma (IFN- γ) dapat mempengaruhi patofisiologi dari depresi melalui pengaktifan monoamine reuptake, merangsang HPA-axis, dan menurunkan produksi serotonin yang disebabkan meningkatnya indolamine- 2,3-dioksigenase (IDO). Peningkatan sitokin proinflamasi di otak dan jaringan perifer dapat mengganggu umpan balik negatif oleh glukokortikoid, dikarenakan sitokin proinflamasi dapat menyebabkan hiperaktivasi dari HPA-axis, sehingga HPA-axis akan memproduksi CRH dan ACTH dalam jumlah berlebih. Keadaan tersebut dapat berkembang menjadi gangguan depresi (Rosyanti dan Hadi, 2018). Produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan akan meningkatkan apoptosis sel epitel saluran pencernaan (Indrayanto dan Diding, 2013). Piroptosis adalah kematian

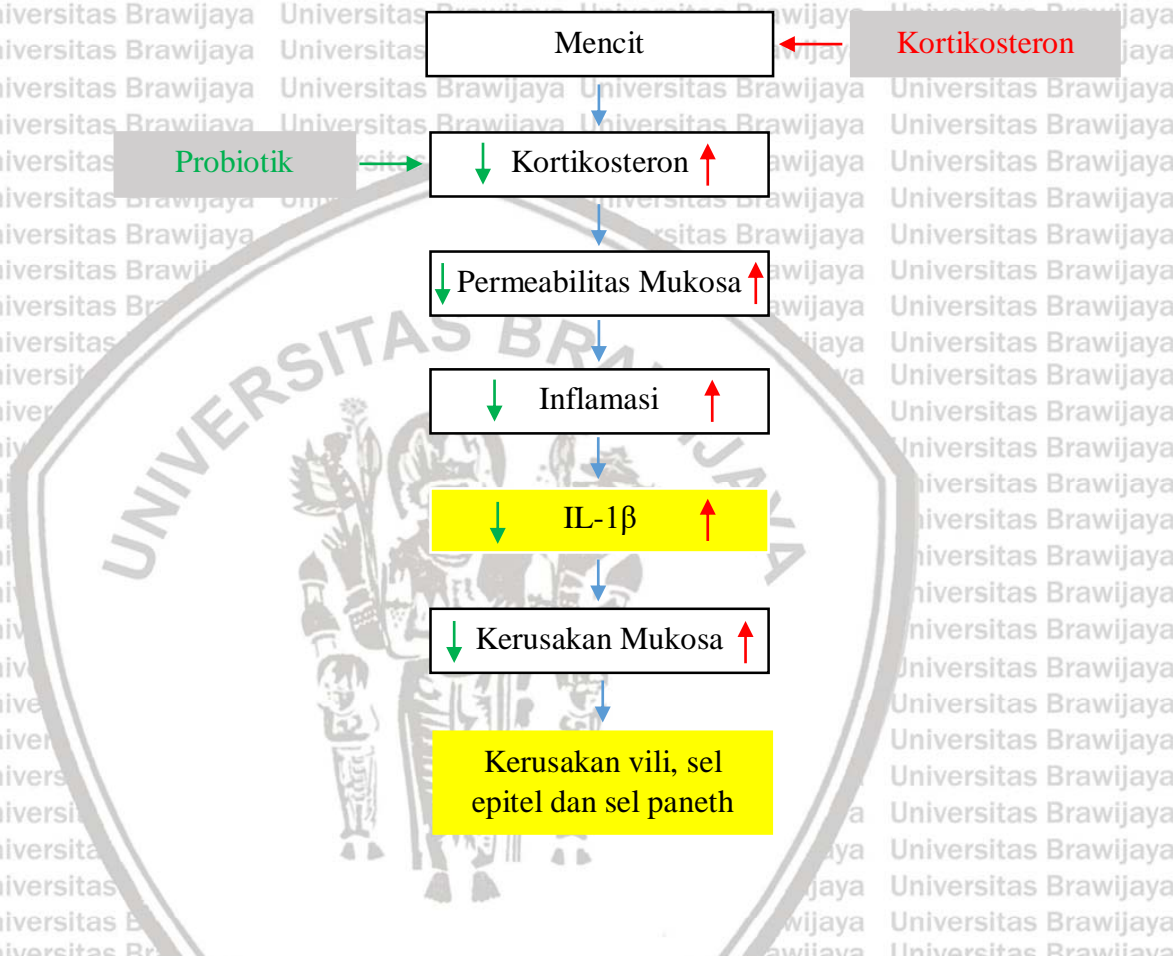
sel terprogram yang diproinflasi oleh lisis sel diikuti oleh aktivasi agresif inflamasi caspase-1 dan IL-1 β . Peningkatan kalsium intraseluler juga diperlukan untuk IL-1 β matang untuk keluar dari sel, yang bergantung pada fosfolipase C. IL-1 β yang dilepaskan akan berikatan dengan reseptornya IL-R1 dan IL-R3. IL-1R2, sebuah reseptor umpan untuk IL-1 β tidak memiliki domain sitoplasmik, tidak memberi sinyal, melainkan menyerap IL-1 β . Reseptor IL-R1 dan IL-R3 terdapat di membran sel. Setelah IL-1 β mengikat IL-1R1, terjadi perubahan struktural yang memungkinkan IL-1R3 untuk mengikat IL-1R1 (Dinarello, 2018).



Gambar 2.4 Hubungan Sitokin Proinflamasi dengan HPA Axis (Rosyanti dan Hadi, 2018).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan:

□ : Variabel Bebas

■ : Variabel Terikat

↑ : Jalur Kortikosteron

↓ : Jalur Probiotik

Kortikosteron yang diinduksikan pada mencit akan menyebabkan terjadinya stres pada mencit. Stres dapat mengaktifkan sistem saraf simpatik dan *Hypothalamic Pituitary Adrenal* (HPA) *axis*. Pengaktifan dari kedua sistem tersebut menyebabkan peningkatan dari air, mineral, dan energi yang digunakan sebagai metabolisme tubuh. HPA-axis akan menginduksi ginjal untuk melepaskan hormon glukokortikoid melalui mekanisme pelepasan *corticotrophin releasing factor* (CRF) dari hipotalamus, kemudian kelenjar pituitary akan terstimulasi dan mensekresi *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH). Pelepasan ACTH akan merangsang kelenjar adrenal untuk melepaskan hormon kortikosteron. Sistem saraf simpatik merespon secara cepat terhadap stres fisik maupun psikologis dengan merealokasikan energi menuju ke berbagai organ dengan regulasi saraf denyut jantung, melepaskan katekolamin (adrenalin dan noradrenalin) dari medulla ginjal, terlibat dalam retensi air dan natrium dari ginjal. Selain ginjal, reabsorpsi air dan natrium juga dapat dicapai pada tingkat usus. Kortikosteron yang diberikan dalam jangka waktu panjang dapat menyebabkan terjadinya stres kronis. Stres kronis dapat menyebabkan jumlah kortikosteron di dalam darah berlebih yang dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas mukosa dan inflamasi. Stres kronis diketahui juga dapat mengganggu regulasi sistem imun. Dalam keadaan normal, glukokortikoid dapat membatalisasi aktivitas dari sistem imun, tetapi dalam keadaan stres kronis, stimulasi kronis dari HPA-axis dapat menyebabkan resistensi dari glukokortikoid pada tingkat sistem imun, sehingga membuat tidak sensitifnya penghambatan dan pengaturan dari sistem

imun. Ketidaksensitifan ini menyebabkan tidak responsifnya penghambatan dari glukokortikoid terhadap pelepasan sitokin dan proliferasi sel. Stres dapat menyebabkan perubahan dari motilitas usus, sekresi dan produksi mucin, perubahan dari habitat dari bakteri di dalam usus, perubahan komposisi bakteri, dan menyebabkan tumbuhnya bakteri patogen di usus.

Dalam keadaan depresi perubahan-perubahan tersebut diakibatkan dari terjadinya disfungsi barier usus yang akan berdampak pada peningkatan permeabilitas mukosa usus. Barrier usus berfungsi sebagai regulasi dari *uptake* air, mineral, nutrisi, dan berfungsi untuk melindungi lumen usus dari kerusakan yang disebabkan bahan berbahaya. Bahan yang bersifat hidrofilik diatasi untuk melalui membran lipid dari sel epitel usus. Peningkatan permeabilitas usus yang diinduksi oleh sistem saraf simpatik kemungkinan dimediasi oleh reseptor β 2-adrenergik yang diekspresikan pada sel epitel usus. Aktivasi dari reseptor β 2-adrenergik menstimulasi *sodium-dependent glucose co-transporter 1* (SGLT1), dan memediasi penyerapan glukosa di dalam usus. *Uptake* dari glukosa aktif, air, dan natrium dimediasi dari aktivitas dari SGLT1 dengan membuka jalur paraseluler sehingga nutrisi dan air dapat diserap secara osmosis. Terjadinya peningkatan dari permeabilitas usus dapat mengakibatkan perubahan habitat bakteri di dalam usus, akibatnya terjadi perubahan komposisi dari bakteri di dalam usus sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi.

Inflamasi dapat terjadi akibat induksi dari *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ke *toll-like receptors* (TLRs), yang mana diekspresikan pada

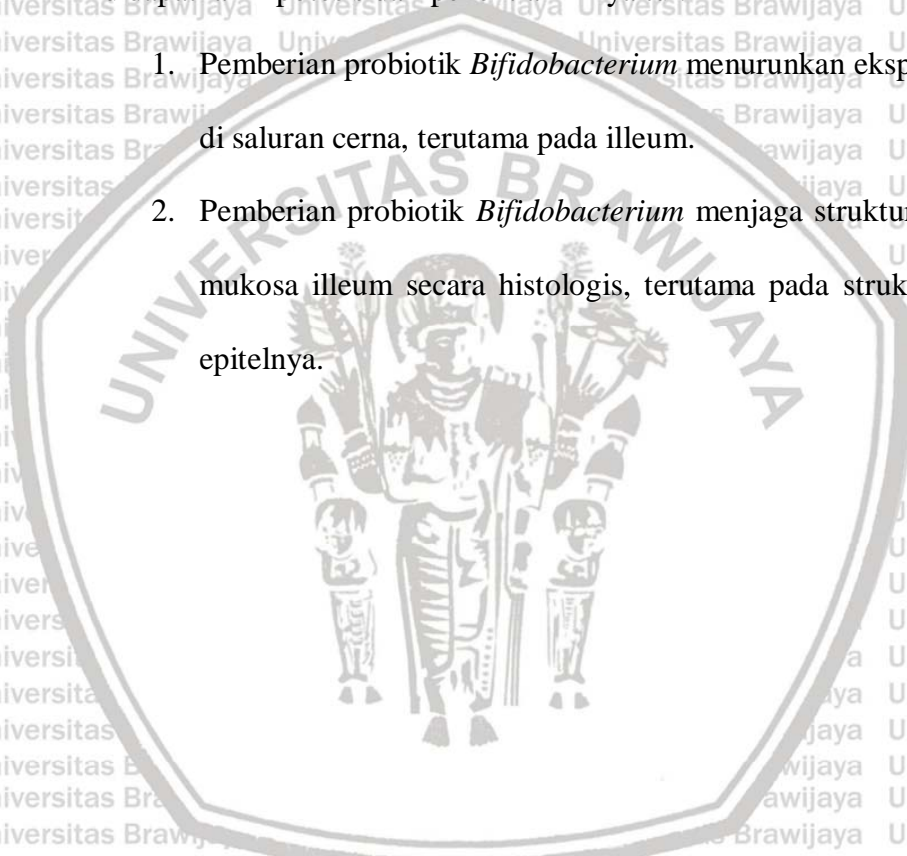
berbagai tipe sel imun, sel adiposa, dan sel endotel. Dari banyak studi diketahui jika PAMP adalah lipopolisakarida atau endotoksin yang mana terdapat di sirkulasi darah dalam jumlah rendah. LPS sendiri juga terdapat di dinding sel bakteri gram negatif yang mana bakteri gram negatif banyak terdapat di dalam usus. Inflamasi dapat diinduksi dari ikatan LPS ke TLR4. Selain itu juga LPS dapat berinteraksi dengan myeloid differential protein 2, CD14, dan LPS-binding protein (LBP). LBP akan mentranspor dan menyalurkan LPS di dalam sirkulasi menjadi lipoprotein, dan akan dinetralkan oleh hepar, atau menyalurkan LPS ke CD14 yang mana akan mengaktifkan TLR4. Aktivasi dari TLR4 mengakibatkan aktivasi dari dua faktor transkripsi, yaitu *activator protein* (AP)-1 dan *nuclear factor - kappa B* (NF- κ B). Aktivasi dari NF- κ B akan menstimulasi dari produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β . IL-1 β merupakan sitokin proinflamasi yang mengarahkan efek pliotrofik pada berbagai sel dan memainkan peran kunci pada inflamasi akut dan kronis selain itu juga pada kelainan autoimun. IL-1 β dapat dilepaskan dari keratinosit, fibroblas, synoviosit, endothelial, neuronal, sel imun seperti makrofag dan sel mast, sel glia seperti sel schwann, mikroglia dan astrosit. IL-1 β juga merupakan sitokin proinflamasi yang banyak diregulasi pada banyak penyakit kelainan inflamasi, dan memiliki peran krusial pada patogenesis penyakit IBD. Produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan diketahui dapat meningkatkan apoptosis sel epitel saluran pencernaan sehingga terjadi kerusakan mukosa usus. Sebagai tambahan, tingginya jumlah dari bakteri patogen dapat meningkatkan

permeabilitas usus dengan cara mengganggu barier epitel dan memicu kematian sel dan inflamasi.

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dijelaskan diatas, sehingga didapatkan hipotesis dari penelitian ini yaitu :

1. Pemberian probiotik *Bifidobacterium* menurunkan ekspresi dari IL-1 β di saluran cerna, terutama pada illeum.
2. Pemberian probiotik *Bifidobacterium* menjaga struktur fisiologis dari mukosa illeum secara histologis, terutama pada struktur yili dan sel epitelnya.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada tanggal 6 November 2019 hingga 25 Januari 2020. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah kandang mencit ukuran 17,5 x 27,75 x 17,5 cm, spuit 1 mL, spuit 5 mL, sonde, tabung reaksi, mikropipet, cawan penguap, mikroskop, kamera digital, pot organ, spektrofotometer, gelas ukur, peralatan bedah.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mencit strain DDY jantan umur 60-90 hari sebanyak 44 ekor, pakan standar comfeed dan air minum, probiotik *Bifidobacterium*, kortikosteron, fluoxetine, pewarna HE (*Hematoxylin-Eosin*), alkohol (70%, 80%, 90%, 95%, 100%), NaCl fisiologis 0,9%, Tween 80, PBS ph 7,4, DMSO, H₂O₂ 3%, *Object glass*, formalin buffer 70%, akuades, parafin, eter 70%, xylol, dan formalin 5%.

4.3. Sampel Penelitian

Hewan model pada penelitian ini menggunakan mencit strain DDY jantan umur 60-90 hari dengan berat rata-rata 35 gram. Mencit diaklimatisasi selama tujuh hari dengan memberikan ransum pakan standar untuk

menyesuaikan dengan kondisi di lingkungan baru. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Keterangan :

p : Jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Kelompok perlakuan membutuhkan ulangan minimal 5 kali dan pada setiap ulangan terdiri dari 5 ekor mencit dan sudah mendapatkan surat keterangan kelaikan etik.

4.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan *post test only group experimental design*. Pada penelitian ini subyek dibagi menjadi 4 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 5 ulangan serta setiap ulangan terdiri dari 5 ekor mencit. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini antara lain :

P1 : Kontrol negatif, diinduksi pelarut (NaCl fisiologis 0,9%, Tween 80, DMSO) melalui subkutan selama 21 hari.

P2 : Kontrol positif, diinduksi kortikosteron dengan dosis 20 mg/kg berat badan, diinjeksi secara subkutan selama 21 hari, kemudian diinduksi fluoxetine selama 14 hari.

P3 : Diinduksi kortikosteron dengan dosis 20 mg/kg berat badan secara subkutan selama 21 hari, kemudian diberi probiotik *Bifidobacterium* dengan dosis 30 mg/kg berat badan per-oral selama 14 hari.

P4 : Diberi probiotik *Bifidobacterium* dengan dosis 30 mg/kg berat badan per oral selama 35 hari dan mulai diinduksi kortikosteron dengan dosis 20 mg/kg berat badan melalui subkutan ketika hari ke-15 hingga 35.

4.5. Variabel Penelitian

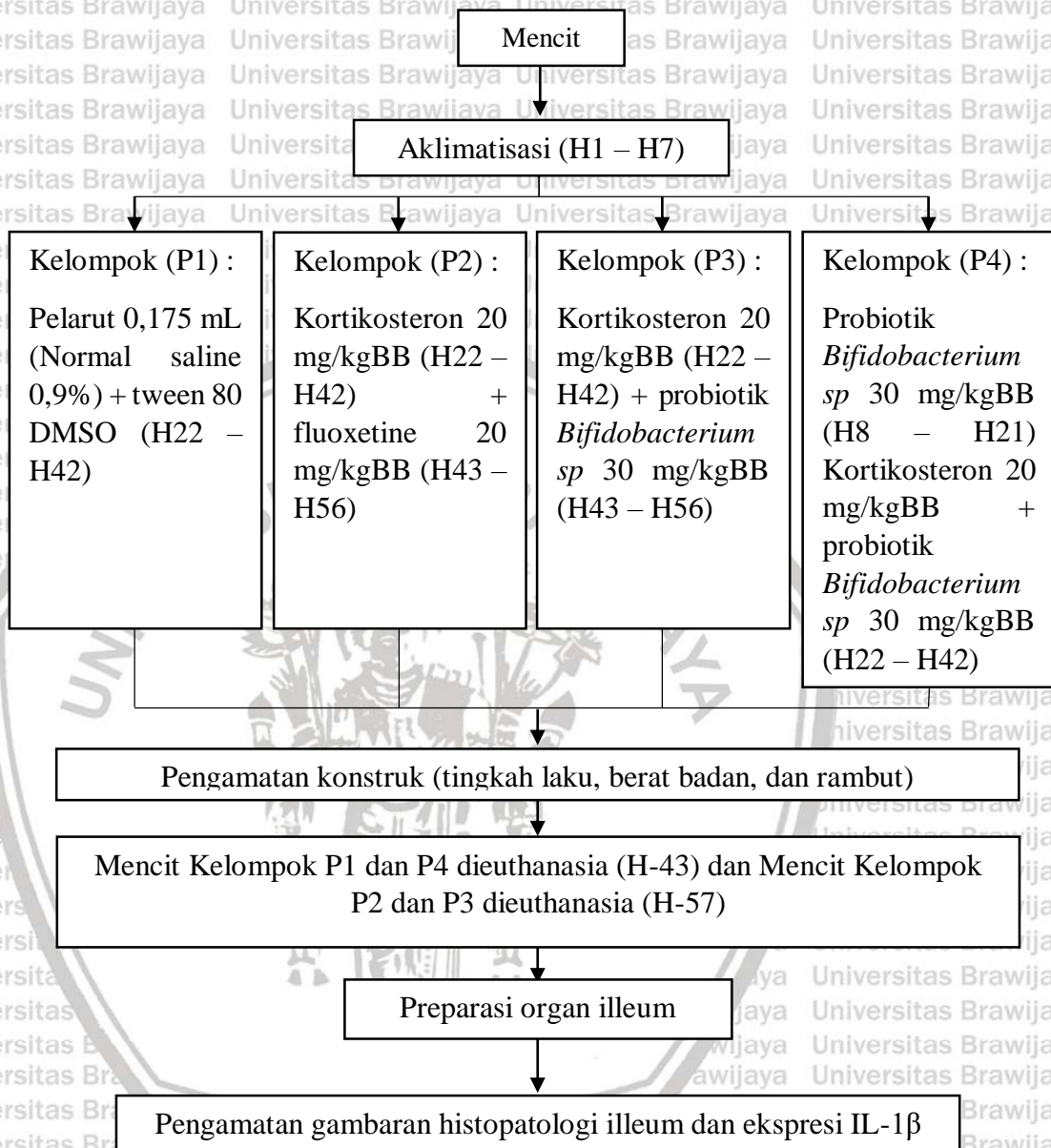
Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Kortikosteron dan probiotik *Bifidobacterium*

Variabel terikat : Ekspresi IL-1 β dan histopatologi organ ileum

Variabel kontrol : Mencit, jenis kelamin, umur

4.6. Tahapan Penelitian



Mencit yang di datangkan dari Pusat Veteriner Surabaya kemudian dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu (H1 – H7). Fungsi aklimatisasi yaitu agar mencit dapat beradaptasi pada lingkungan dan pakan yang baru. Mencit kemudian dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok terapi menggunakan

probiotik *Bifidobacterium* sp, dan kelompok preventif menggunakan probiotik *Bifidobacterium* sp. Kemudian kelompok perlakuan 4 (P4) diberi probiotik *Bifidobacterium* sp secara per-oral sebagai upaya preventif dengan dosis 30 mg/KgBB selama 14 hari (H8 – H21). Kelompok perlakuan 1 (P1) diberikan pelarut dari kortikosteron melalui injeksi subkutan (NaCl fisiologis 0,9% + Tween 80 0,1% + DMSO 0,1%) sebanyak 0,175 mL selama 21 hari (H22 – H42). Kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3) diberikan kortikosteron melalui injeksi subkutan dengan dosis 20 mg/KgBB selama 21 hari (H22 – H42) untuk membuat mencit model depresi. Untuk kelompok perlakuan 4 (P4) diberikan induksi kortikosteron dengan dosis 20 mg/KgBB dan diberikan probiotik *Bifidobacterium* sp dengan dosis 30 mg/KgBB selama 21 hari (H22 – H42). Kemudian untuk kelompok perlakuan 2 (P2) diberikan terapi menggunakan fluoxetine melalui injeksi subkutan dengan dosis 20 mg/KgBB selama 14 hari (H43 – H56), dan untuk kelompok perlakuan 3 (P3) diberikan terapi menggunakan probiotik *Bifidobacterium* sp secara per-oral dengan dosis 30 mg/KgBB selama 14 hari (H43 – H56). Sebelum dilakukan eutanasi dan nekropsi, dilakukn pengamatan konstruk (tingkah laku, berat badan, dan rambut). Kemudian mencit dilakukan euthanasi dan nekropsi, untuk kelompok perlakuan 1 dan 4 (P1 dan P4) di euthanasi pada hari ke-43 (H43), dan untuk kelompok perlakuan 2 dan 3 (P2 dan P3) dieuthanasi pada hari ke-57 (H57). Euthanasi pada mencit menggunakan metode dislokasi *cervical*. Setelah dilakukan nekropsi, maka dilakukan pengkoleksian organ ileum. Setelah itu organ di buat preparat histopatologi dan immunohistokimia,

kemudian dilakukan pengamatan preparat histopatologi dan immunohistokimia menggunakan mikroskop. Preparat histopatologi yang diamati adalah kerusakan mukosa epitel ilumnya (sel epitel, vili dan sel paneth), untuk preparat imunohistokimia yang diamati adalah ekspresi dari IL-1 β yang diekspresikan pada sitoplasma sel epitel.

4.7. Prosedur Kerja

4.7.1. Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah hewan coba jenis mencit. Mencit yang digunakan di dalam penelitian ini diperoleh dari Pusat Veteriner Farma Surabaya, Jawa Timur. Strain mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain DDY. Jumlah total mencit yang digunakan sebanyak 20 ekor yang kemudian dibagi menjadi empat kelompok. Setelah mencit datang, mencit diadaptasikan / aklimatisasi selama tujuh hari terhadap kandang, pakan, dan lingkungan yang baru. Mencit diberikan ransum pakan standar dan minum secara *ad libitum*.

Kandang yang digunakan yang berukuran sekitar 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Kandang tersebut terbuat dari bahan plastik yang mudah untuk dibersihkan. Atap kandang ditutup dengan kawat ram. Lingkungan kandang terbebas dari polusi, baik polusi udara maupun polusi suara. Suhu ruangan maksimal di lingkungan kandang berkisar 22–24 °C dengan kelembapan 50-60 %.

4.7.2. Persiapan *Bifidobacterium sp* sebagai Probiotik

Sediaan probiotik *Bifidobacterium sp* yang digunakan dalam penelitian ini berupa serbuk yang dikemas dalam bentuk kapsul.

Kode produksi dan nama produk tertera pada kemasan. Dosis pemberian probiotik *Bifidobacterium sp* adalah 30 mg/kg BB. Kebutuhan total *Bifidobacterium sp* yang digunakan selama penelitian ini dengan berat badan rata-rata 35 gram per-ekor adalah 294 mg. *Bifidobacterium sp* tersebut dilarutkan kedalam NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 140 mL.

Probiotik diberikan secara peroral pada pukul 11.30 WIB menggunakan sonde. Larutan probiotik diberikan sebanyak 0,5 mL untuk setiap mencit.

4.7.3. Persiapan Pemberian Kortikosteron

Kortikosteron yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kortikosteron yang dibutuhkan selama dilakukannya penelitian ini sebanyak 220,5 gr. Dosis pemberian kortikosteron yaitu 20 mg/kgBB. Penggunaan kortikosteron harus dilarutkan terlebih dahulu didalam NaCl fisiologis 0,9%, tween 80, dan DMSO. Pelarut kortikosteron terdiri dari 55,125 mL NaCl fisiologis 0,9%, 0,055 mL tween 80, dan 0,055 DMSO. Kortikosteron diberikan secara injeksi pada subkutan sebanyak 0,175 mL untuk setiap

mencit. Pemberian kortikosteron diberikan sebelum pemberian probiotik yaitu setiap pukul 11.00 WIB.

4.7.4. Nekropsi Mencit

Nekropsi dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada hari ke-43 untuk kelompok P1 dan P4, sedangkan untuk kelompok P2 dan P3 dilakukan pada hari ke-57. Semua peralatan bedah, sebelum digunakan disterilisasi menggunakan alkohol 70%. Mencit yang dinekropsi adalah mencit dari setiap perlakuan. Dalam setiap perlakuan diambil masing-masing 5 sampel mencit dari setiap ulangannya. Nekropsi bertujuan untuk mengoleksi organ ileum dari mencit untuk dilakukn uji histologi dan pewarnaan imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi IL-1 β .

4.7.5. Pembuatan Preparat Histologi

Semua kelompok setelah dilakukan nekropsi, organ ileum diambil dan dilakukan pengamatan. Pengambilan organ dilakukan secara benar dan teliti agar tidak terjadi kerusakan. Sampel organ pertama-tama dibersihkan menggunakan NaCl fisiologis 0,9%. Pembuatan preparat histologi terdiri dari beberapa tahapan, yaitu fiksasi, dehidrasi dan infiltrasi, pembersihan. Infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, proses peletakan di kaca objek, dan terakhir pewarnaan dengan *Hematoxylin-Eosin*.

4.7.6. Pengamatan Preparat Histopatologi

Pengamatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya menggunakan mikroskop binokuler jenis T340B (Amscope) dengan perbesaran 100x, 400x, dan 1000x didokumentasi menggunakan kamera digital Sony α5100. Hal yang diamati yaitu dengan membandingkan perbedaan antara perubahan-perubahan pada gambaran histopatologi organ ileum dengan gambaran histologi ileum pada keadaan normalnya. Bagian yang dapat dilihat perbedaannya yaitu pada kerusakan vili dan sel epitel ileum.

4.7.7. Pembuatan Imunohistokimia

Preparat direndam dalam xylol I dan II, alkohol bertingkat secara berurutan (100%, 90%, 80%, 70%) untuk dehidrasi. Dicuci dalam PBS pH 7,4 3x5 menit. Direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam DI water) selama 20 menit dengan suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x5 menit. Ditetesi blocking peroksidase 40 menit suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x5 menit. Ditambahkan antibodi primer (IL-1 β) diinkubasi 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x5 menit. Kemudian ditambahkan antibodi sekunder berlabel biotin (Giotin Anti Rat biotin labeled) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x5 menit. Ditetesi SAHRP dan diinkubasi 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 3x5 menit. Preparat ditambahkan

Chromogen DAB selama 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan aquades 3x5 menit. Diberi pewarna meyer selama 5 menit dengan suhu ruang. Dicuci dengan air pH alkalis 3x5 menit. Dilakukan mounting dengan entellan.

4.7.8. Analisa Data

Data variabel ekspresi IL-1 β yang diamati di dalam penelitian berupa data kuantitatif menggunakan *One Way ANOVA*, kemudian dilanjutkan dengan uji tukey apabila data menunjukkan hasil yang signifikan, sedangkan untuk gambaran histopatologi illeum dilakukan analisa dengan membaca preparat dan tiap preparat dibaca dalam 5 lapang pandang dengan perbesaran 400x. Untuk preparat histopatologi yang dibaca adalah perubahan struktur epitel mukosa illeum mencit yang diamati setiap lapang pandang dengan penilaian berdasarkan modifikasi Barthel Manja.

Tabel 4.1 Skor Integritas Epitel Mukosa (Harahap, 2011)

No	Skor	Integritas Epitel Mukosa
1	0	Tidak ada perubahan patologis
2	1	Deskuamasi epitel
3	2	Erosi permukaan epitel (gap 1-10 sel epitel/lesi)
4	3	Erosi epitel (gap > 10 sel epitel/lesi)

Deskuamasi merupakan mengelupasnya bagian luar permukaan epitel. Erosi dapat diartikan sebagai hilangnya sel epitel

sampai ke lapisan sel basal. Ulserasi merupakan hilangnya epitel yang mana lebih dalam dari erosi dan dapat mencapai lapisan submukosa. Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan program komputer SPSS, kemudian diteruskan dengan uji parametric *Oneway Anova*.

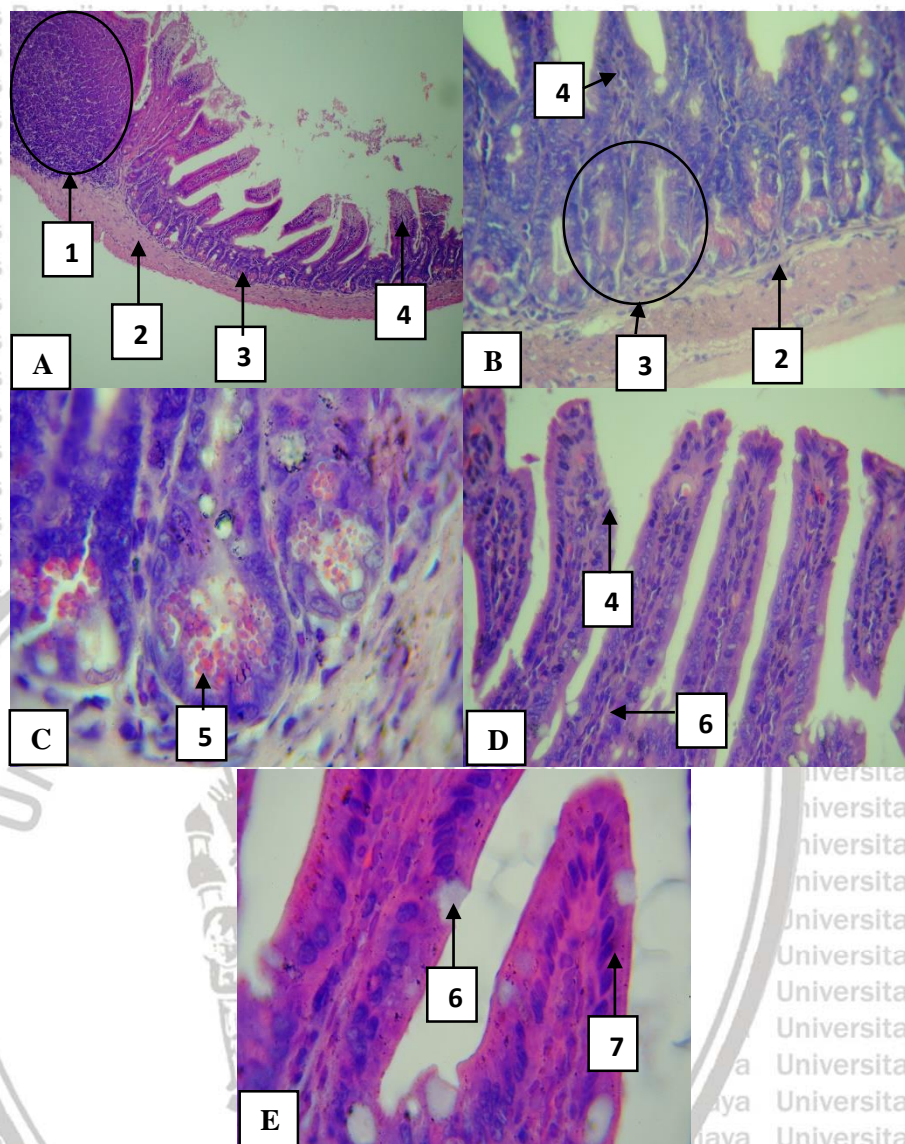


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian Pengaruh Pemberian Probiotik *Bifidobacterium sp* Terhadap Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron

5.1.1. Pengaruh Pemberian Probiotik *Bifidobacterium sp* Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron

Usus halus memiliki ciri yaitu terdapat tonjolan seperti jari yang disebut sebagai vili. Vili terdiri dari lapisan sel epitel kolumnar yang berjajar dengan mikrovili yang membentuk *starited borders*, dan kelenjar intestinal yang tubular dan pendek (kripte Lieberkuhn). Secara gambaran histologis, struktur dari ileum hampir sama dengan bagian usus halus lainnya (duodenum dan jejunum). Anatomi yang membedakan ileum dengan duodenum dan jejunum adalah dinding ileum lebih tipis, lipatan lipatan mukosa (plika sirkularis) yang lebih sedikit dan kurang menonjol, vasa recta yang lebih pendek, banyak terdapat *arcade arteriae*, dan lemak mesenterium lebih banyak. Di dalam ileum terdapat karakteristik yaitu terdapat *payer patch*. *Payer patch* adalah agregasi dari nodul limfatik yang berada pada dinding ileum berlawanan dengan penempelan mesenterium, dimana didalamnya terdapat beberapa limfosit T dan banyak mengandung limfosit B. Vili dari ileum berbentuk menyerupai jari tetapi lebih pendek jika dibandingkan dengan vili dari jejunum. Sel paneth di ileum dapat ditemukan di dasar kripte Lieberkuhn. Sel paneth berperan dalam imunitas alami. Pada epitel dari kriptus ini terdiri dari sel absorptif (Hartanto, 2017).



Gambar 5.1 Histopatologi illeum mencit

Keterangan Gambar :

Gambar A: perbesaran 100x : Gambar B : perbesaran 400x ; Gambar C: Kripte Lieberkuhn perbesaran 1000x; Gambar D: Perbesaran 400x dan Gambar E: perbesaran 1000x. Pengambilan gambar menggunakan mikroskop binokuler (Amscope) dengan kamera digital Sony α5100.

Payer patch (1), muskularis mukosa usus (2), kripte Lieberkuhn (3), vili (4), sel paneth (5), sel goblet (6), dan epitel kolumner usus (7).

20 ekor mencit strain ddy (Deutschland, Denken, and Yoken), tidak terdapat satupun ekor mencit yang mati, dan semua mencit memenuhi syarat sebagai sampel penelitian. Sampel penelitian diambil secara acak dan independen satu sama lain. Hasil pengamatan organ illeum mencit secara mikroskopis dari berbagai kelompok penelitian akan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Data yang diperoleh dari hasil scoring gambaran histopatologi epitel mukosa illeum berupa data rerata scoring pada setiap kelompok perlakuan. Data kemudian diolah menggunakan program komputer SPSS menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA memiliki syarat yaitu data harus berdistribusi normal dan data berasal dari varians yang sama sehingga perlu dilakukan uji normalitas dan homogenitas.

Data pengamatan skor gambaran histopatologi illeum dapat dilihat pada **Lampiran 8**. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk. Pada uji normalitas diperoleh distribusi data yang normal ($p > 0,05$) **Lampiran 5**. Hasil uji homogenitas varians diperoleh nilai $p=0,693$ ($p>0,05$) **Lampiran 5**, sehingga dapat dikatakan bahwa variansi data adalah homogen. Syarat dari uji ANOVA telah terpenuhi sehingga dapat dilakukan uji *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95%, dan diperoleh nilai $p=0,424$ ($p>0,05$), yang artinya menerima H_0 yaitu tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok. Hal ini juga didukung dengan uji lanjutan tukey **Lampiran 5**, yang mengatakan bahwa pada setiap kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan yang bermakna.

Tabel 5.1 menampilkan hasil dari rata-rata dan standar deviasi dari skor total integritas epitel mukosa pada setiap kelompok. Terlihat jika skor rata-rata integritas epitel mukosa ileum kelompok 1 paling rendah ($0,57 \pm 0,34$) daripada kelompok lain, sedangkan rata-rata kelompok 3 ($1,00 \pm 0,40$) merupakan yang paling tinggi daripada kelompok yang lain.

Tabel 5.1 Nilai rata-rata dan standar deviasi skor integritas epitel mukosa ileum

Kelompok Penelitian	Mean	\pm SD
Kelompok 1	0,57	0,34
Kelompok 2	0,80	0,58
Kelompok 3	1,00	0,40
Kelompok 4	0,92	0,30

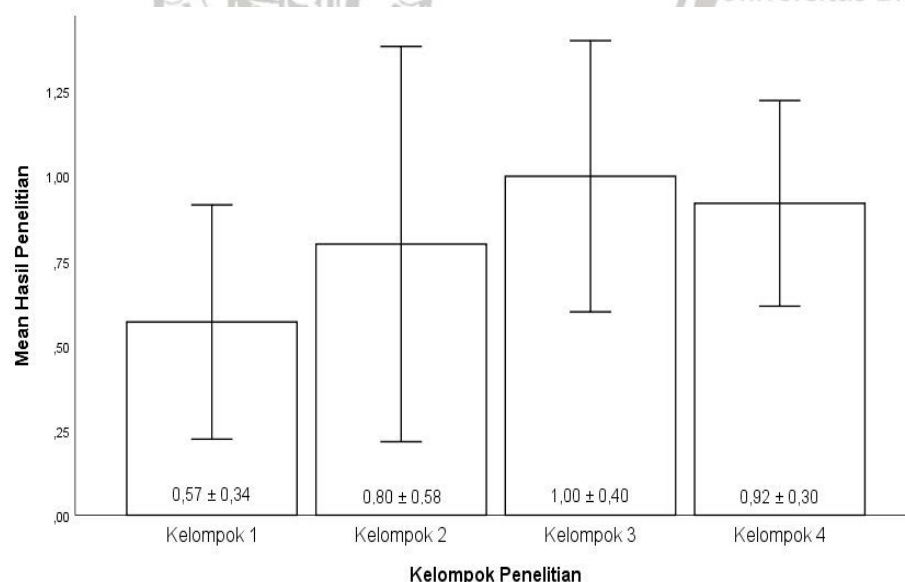
Keterangan :

Kelompok 1 : Kontrol Negatif

Kelompok 2 : Kontrol Positif

Kelompok 3 : Terapi

Kelompok 4 : Preventif



Gambar 5.2 Diagram batang rata-rata dan standar deviasi skoring integritas mukosa ileum mencit model depresi

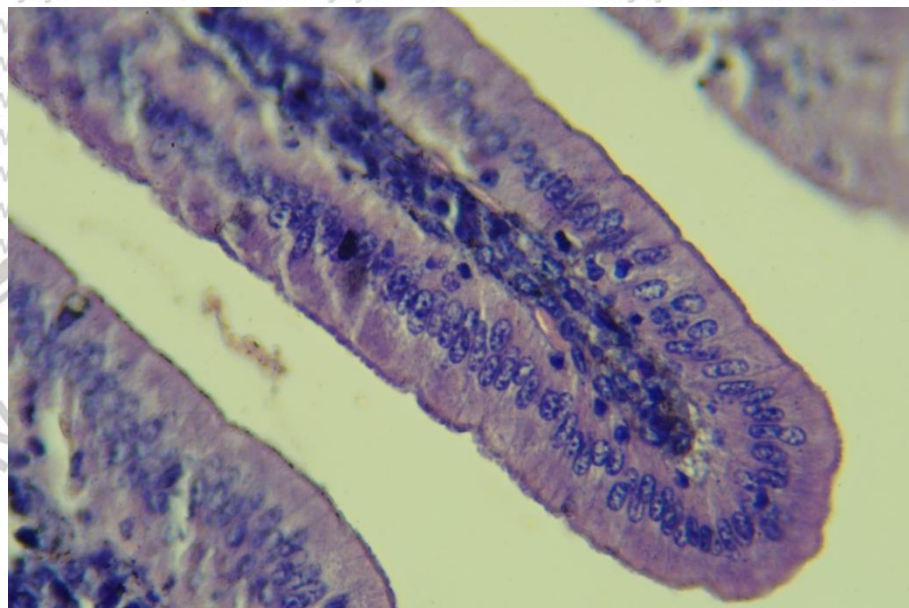
Setiap kelompok perlakuan (K) akan dibandingkan nilainya (rerata \pm SD) berdasarkan hasil uji tukey pada **Lampiran 5** untuk menentukan kelompok perlakuan mana yang lebih baik untuk mengurangi dampak depresi pada mencit model depresi yang diberikan kortikosteron terhadap integritas epitel ileum mencit. K1 ($0,57 \pm 0,34$) sebagai kontrol negatif dibandingkan dengan K2 ($0,80 \pm 0,58$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna. K2 ($0,80 \pm 0,58$) dibandingkan dengan K3 ($1,00 \pm 0,40$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna. K2 ($0,80 \pm 0,58$) dibandingkan dengan K4 ($0,92 \pm 0,30$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna. K3 ($1,00 \pm 0,40$) dibandingkan dengan K4 ($0,92 \pm 0,30$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna.

Dari data perbandingan tersebut, diketahui jika kelompok 1 (kontrol negatif) memiliki skor integritas lebih rendah dari setiap perlakuan. Kelompok 2 memiliki skor lebih rendah dari kelompok 3, tetapi kelompok 2 memiliki skor yang lebih tinggi daripada kelompok 4. Kelompok 3 memiliki skor yang lebih tinggi daripada kelompok 4.

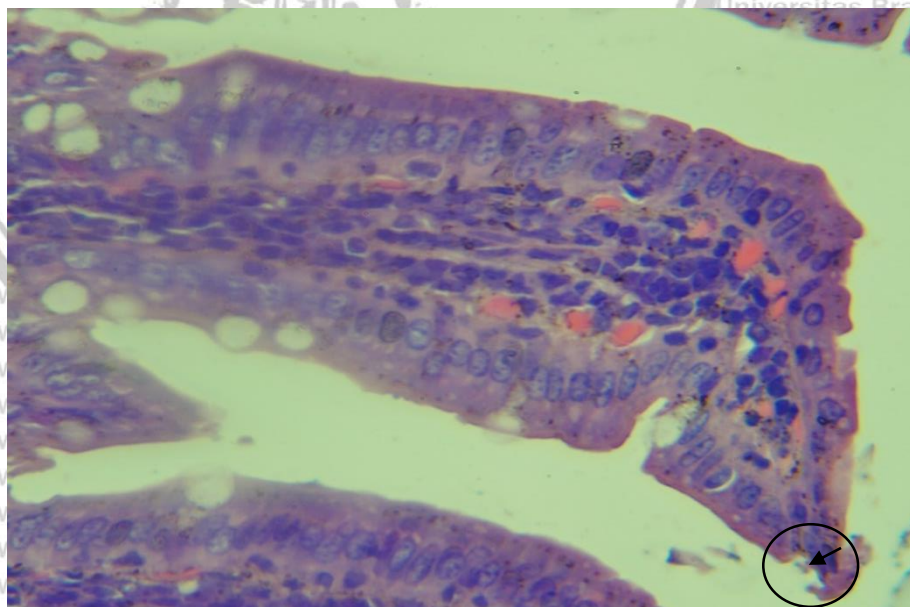
Depresi dapat menurunkan integritas mukosa ileum mencit, dimana tampak pada kelompok yang mengalami depresi akibat pemberian kortikosteron. Pada kelompok 3 dan 4, menurut skor integritas yang didapatkan, menunjukkan perbaikan integritas mukosa ileum mencit yang mana nilainya mendekati dengan kelompok yang tidak diberi stres.

Perbaikan integritas mukosa ileum dari kelompok 3 dan 4 akibat dari pemberian probiotik *Bifidobacterium sp.*

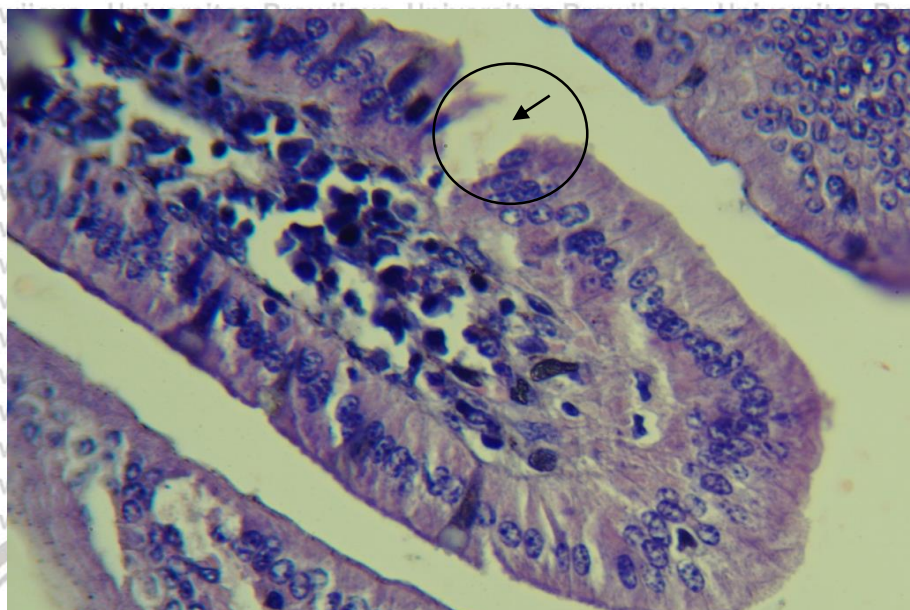
Gambaran histopatologi epitel mukosa ileum normal, adanya deskuamasi epitel, erosi, dan ulserasi diilustrasikan pada **Gambar 5.3** sampai **Gambar 5.6**.



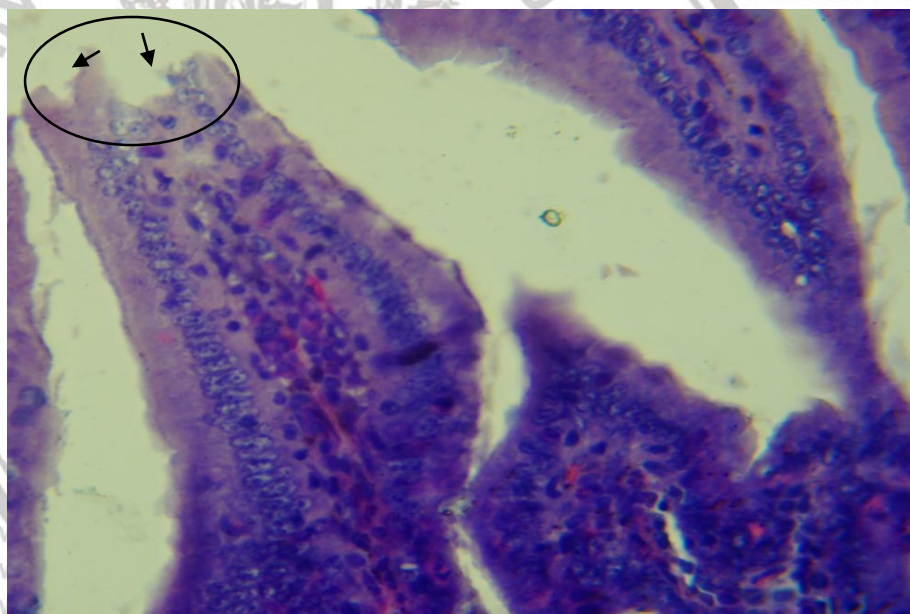
Gambar 5.3 Skor 0 : Epitel mukosa ileum mencit normal (400x)



Gambar 5.4 Skor 1 : Deskuamasi Epitel Mukosa Ileum yang Ditunjukkan oleh Anak Panah (400x)



Gambar 5.5 Skor 2 : Erosi Epitel Mukosa Ileum yang Ditunjukkan oleh Anak Panah (400x)

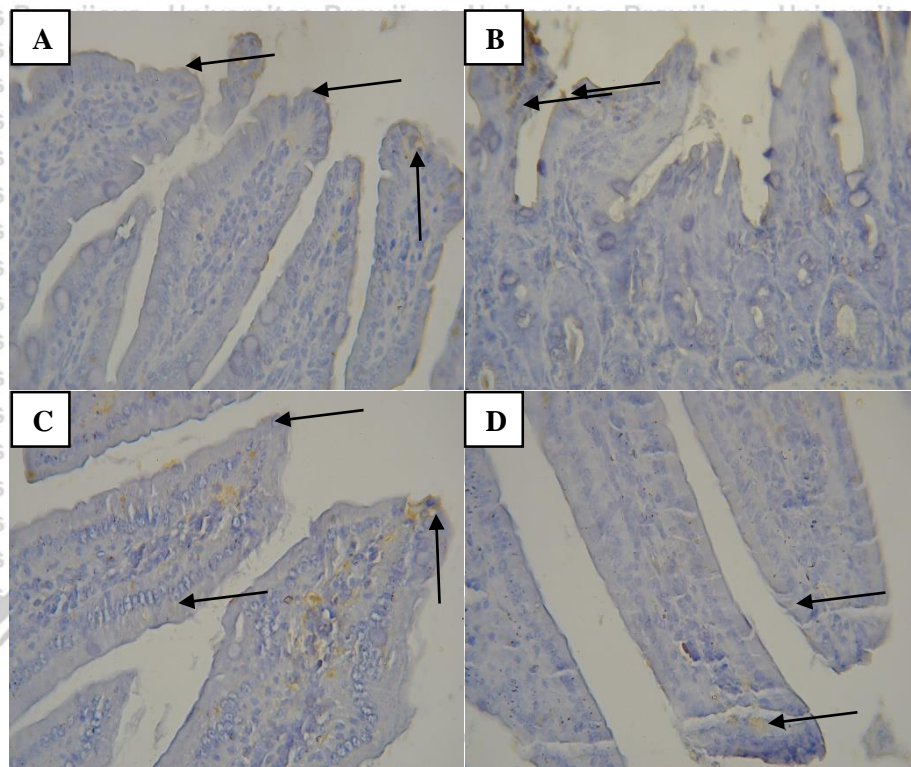


Gambar 5.6 Skor 3: Erosi Epitel Mukosa Ileum Dengan Gap >10 Lesi yang Ditunjukkan oleh Anak Panah (400x)

5.1.2. Pengaruh Pemberian Probiotik *Bifidobacterium* sp Terhadap Ekspresi IL-1 β pada Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron

Pengamatan ekspresi IL-1 β menggunakan metode imunohistokimia (IHK) yang dikonfirmasi dengan penggunaan antibodi *anti-mice*. Ekspresi IL-1 β ditunjukkan dengan warna kuning kecoklatan (ditunjukkan oleh anak panah) pada ileum mencit **Gambar**

5.7. Warna kuning kecoklatan merupakan representasi dari adanya ikatan dari antigen (IL-1 β) dengan antibodi (*anti mice* IL-1 β). Hasil pengamatan mikroskopis dari IHK ileum mencit (perbesaran 400x) kemudian dihitung menggunakan teknik perhitungan hasil imunohistokimia seperti pada penelitian (Soini, *et al.*, 1998; Pizem, J. and Cor,A., 2003) yang dimodifikasi untuk jaringan ileum, penelitian ini telah selesai menghitung jumlah sel epitel area ileum, yang mengekspresikan IL1 (warna coklat pada sitoplasma sel, tanda panah **Gambar 5.7**).



Gambar 5.7 Ekspresi IL-1 β pada epitel organ ileum mencit dengan metode immunohistokimia pada perbesaran 400x.

Keterangan: Kelompok 1 (Gambar A), kelompok 2 (Gambar B), kelompok 3 (Gambar C), dan kelompok 4 (Gambar D). Anak panah menunjuk ekspresi IL-1 β . Pengambilan gambar menggunakan mikroskop binokuler (Amscope) dengan kamera digital Sony α 5100.

Rerata dan standar deviasi hasil perhitungan masing-masing kelompok tertuang dalam **Tabel 5.2**. Data kemudian diolah menggunakan program komputer SPSS menggunakan uji ANOVA. Uji ANOVA memiliki syarat yaitu data harus berdistribusi normal dan data berasal dari varians yang sama sehingga perlu dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk. Uji normalitas didapatkan $p > 0,05$ yang mengartikan bahwa sebaran data adalah normal. Pada uji normalitas diperoleh distribusi data yang

normal ($p > 0,05$) **Lampiran 6**. Hasil uji homogenitas varians diperoleh nilai $p=0,831$ ($p>0,05$) **Lampiran 6**, sehingga dapat dikatakan bahwa variansi data adalah homogen. Syarat dari uji ANOVA telah terpenuhi sehingga dapat dilakukan uji *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95%, dan diperoleh nilai $p=0,214$ ($p>0,05$), yang artinya menerima H_0 yaitu tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok. Hal ini juga didukung dengan uji lanjutan tukey **Lampiran 6**, yang mengatakan bahwa pada setiap kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan yang bermakna.

Tabel 5.2 menampilkan hasil dari rata-rata dan standar deviasi dari ekspresi IL-1 β pada illeum mencit pada setiap kelompok. Terlihat jika rata-rata ekspresi IL-1 β pada epitel illeum mencit kelompok 4 paling rendah ($8,82 \pm 2,61$) daripada kelompok lain, sedangkan rata-rata kelompok 2 ($13,76 \pm 4,81$) merupakan yang paling tinggi daripada kelompok yang lain.

Tabel 5.2 Rata-rata Jumlah Ekspresi IL-1 β pada Ileum Mencit pada Setiap Kelompok Perlakuan

Kelompok Penelitian	Mean	\pm SD
Kelompok 1	11,27	3,63
Kelompok 2	13,76	4,81
Kelompok 3	12,31	2,94
Kelompok 4	8,83	2,62

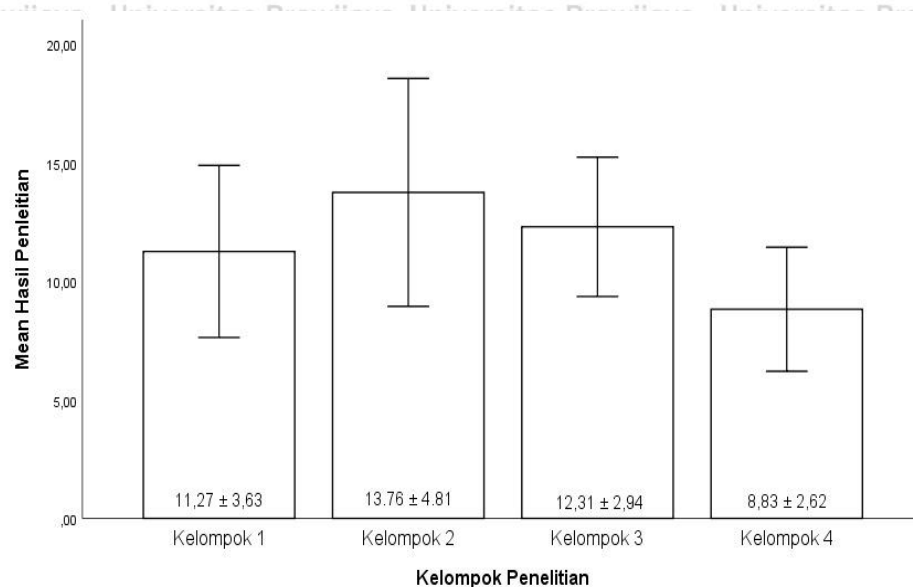
Keterangan :

Kelompok 1 : Kontrol Negatif

Kelompok 2 : Kontrol Positif

Kelompok 3 : Terapi

Kelompok 4 : Preventif



Gambar 5.8 Diagram batang rata-rata dan standar deviasi ekspresi IL-1 β pada ileum mencit model depresi

Setiap kelompok perlakuan (K) akan dibandingkan nilainya (rerata \pm SD) berdasarkan hasil uji tukey pada **Lampiran 6** untuk menentukan kelompok perlakuan mana yang lebih baik dalam menurunkan dampak depresi pada mencit model depresi yang diberikan kortikosteron terhadap ekspresi IL-1 β pada illeum mencit. K1 ($11,27 \pm 3,63$) sebagai kontrol negatif dibandingkan dengan K2 ($13,76 \pm 4,81$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna. K2 ($13,76 \pm 4,81$) dibandingkan dengan K3 ($12,31 \pm 2,94$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna. K2 ($13,76 \pm 4,81$) dibandingkan dengan K4 ($8,83 \pm 2,62$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna. K3 ($12,31 \pm 2,94$) dibandingkan dengan K4 ($8,83 \pm 2,62$) tidak memiliki perbedaan yang bermakna.

Dari data perbandingan tersebut, diketahui jika kelompok 1 (kontrol negatif) memiliki jumlah ekspresi IL-1 β lebih rendah dari kelompok 2 dan kelompok 3, tetapi lebih tinggi daripada kelompok 4. Kelompok 2 memiliki jumlah ekspresi IL-1 β yang lebih tinggi daripada kelompok perlakuan lainnya. Kelompok 3 memiliki jumlah ekspresi IL-1 β yang lebih tinggi daripada kelompok 4.

5.2. Pembahasan Pengaruh Pemberian Probiotik *Bifidobacterium* sp Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum dan Ekspresi IL-1 β pada Mencit Model Depresi yang Diinduksi Kortikosteron.

Kortikosteron yang diberikan dalam waktu yang lama memiliki dampak buruk terhadap tubuh. Menurut penelitian (Zhao, *et al.*, 2008) kortikosteron yang diinjeksikan pada mencit dengan dosis 20 mg/kg badan secara subkutan secara rutin dalam waktu 3 minggu dapat menyebabkan mencit mengalami depresi melalui aktivasi dari HPA axis dan sistem saraf simpatis secara terus menerus untuk menghasilkan hormon glukokortikoid dari kelenjar adrenal dan katekolamin dari medulla ginjal (De Punder and Leo, 2015).

Katekolamin (adrenalin dan noradrenalin) yang dilepaskan dari medulla ginjal akan meningkatkan dari penyerapan air dan usus di dalam usus dimana paralel dengan peningkatan permeabilitas usus. Peningkatan permeabilitas usus dan rusaknya barier usus akan menyebabkan perubahan dari komposisi mikroflora di dalam usus sehingga bakteri patogen dapat tumbuh lebih banyak dan bakteri dapat masuk ke dalam submukosa vili usus

(De Punder and Leo, 2015).). Peningkatan permeabilitas juga menyebabkan bakteri dan metabolitnya dapat melewati membran perifer usus dan mengaktifkan respon sistem imun dikarenakan pelepasan dari sitokin proinflamasi (Carlessi, *et al*, 2019).

Fluoxetine diketahui sebagai obat antidepresan golongan SSRI yang sering digunakan sebagai terapi pada pasien depresi. (Ningtyas, dkk., 2018).

Fluoxetine dapat menurunkan jumlah sitokin proinflamasi (IL-1 β dan TNF- α) di dalam darah melalui penurunan kadar COX-2 (Cyclooxygenase-2).

Dampak dari penurunan kadar COX-2 akan mengakibatkan penurunan aktivasi jalur NF-kB dan penurunan aktivasi inflammasome. Penurunan dari aktivasi NF-kB akan menyebabkan produksi dari sitokin IL-1 β akan menurun. Penurunan produksi sitokin proinflamasi akan menyebabkan munculnya sitokin anti inflamasi untuk mengakhiri proses inflamasi sehingga terjadi penurunan dari inflamasi. Penurunan inflamasi dapat memulai proses perbaikan dari epitel (Dionisie, *et al*, 2021).

Diketahui bahwa beberapa probiotik seperti *Bifidobacterium sp* dapat menghasilkan SCFA. *Bifidobacterium sp* dapat memproduksi SCFA dengan cara menurunkan pH dari usus, membentuk barier biologis, dan mensekresikan senyawa antimikroba untuk melemahkan bakteri patogen di dalam usus (Carlessi *et al*, 2019). *Bifidobacterium sp* diketahui dapat memproduksi SCFA, yang paling utama yaitu SCFA berupa asam format dan asam asetat dengan jalur fermentasi. SCFA sendiri merupakan hasil produksi dari mikroba usus melalui fermentasi dari polisakarida kompleks yang

memiliki efek imunomodulator. SCFA yang diproduksi oleh *Bifidobacterium* *sp* dapat membantu menghentikan proses inflamasi di dalam usus melalui penurunan aktivasi NF- κ B sehingga kadar sitokin proinflamasi IL-1 β dan kadar COX-2 di dalam tubuh menurun (Kim, *et al.*, 2010). SCFA sendiri memiliki efek positif terhadap tubuh yaitu sebagai faktor esensial dalam mempertahankan integritas usus; mengurangi pH lumen usus; menghambat bakteri pembusuk dan bakteri patogen; melindungi integritas epitel usus dari kerusakan mekanik, kimia, maupun dari bakteri; meningkatkan bioavailabilitas mineral, mensuplai energi ke mukosa usus; menstimulasi sistem imun; memiliki peran sebagai anti-inflamasi dan *antitumorigenic*; dan mengurangi resiko penyakit infeksius di dalam usus (Gorgun and Ersan, 2020). Menurunnya sitokin proinflamasi akan menyebabkan tubuh dapat memproduksi sitokin anti-inflamasi untuk menghentikan proses inflamasi. Proses inflamasi yang menurun akan menyebabkan berlangsungnya proses perbaikan mukosa ileum menciit.

Probiotik memiliki cara kerja yang hampir sama dengan fluoxetin dimana keduanya dapat menurunkan sitokin proinflamasi (IL-1 β) melalui penurunan aktivitas NF- κ B sehingga terjadi peningkatan integritas mukosa ileum menciit model depresi. Pada hasil ANOVA tidak terlihat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan yang diberi obat gold standar fluoxetine maupun yang diberikan dengan probiotik *Bifidobacterium* *sp* (terapi dan preventif). Dari hasil skoring gambaran histopatologi dan jumlah ekspresi IL-1 β memiliki hasil yang

sinkron dan saling mendukung dimana kelompok perlakuan 3 (P3) sebagai upaya terapi menggunakan probiotik *Bifidobacterium sp* memiliki nilai skoring integritas mukosa dan ekspresi IL-1 β yang lebih tinggi daripada kelompok perlakuan 4 (P4) yang merupakan kelompok sebagai upaya preventif menggunakan probiotik *Bifidobacterium sp*. Untuk rata-rata dari kelompok perlakuan, yang paling mendekati dari kelompok kontrol negatif (tidak depresi) adalah kelompok 4 (preventif menggunakan probiotik *Bifidobacterium sp*), sehingga dapat dikatakan pemberian probiotik *Bifidobacterium sp* secara preventif lebih efektif dalam menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi IL-1 β dan meningkatkan integritas mukosa ileum daripada diberikan sebagai upaya terapi.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil dan dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian probiotik *Bifidobacterium sp* pada mencit model depresi mampu menurunkan ekspresi IL-1 β pada ileum mencit.
2. Pemberian probiotik *Bifidobacterium sp* pada mencit model depresi mampu memperbaiki struktur mukosa ileum mencit yang dilihat dari struktur susunan epitel dan vili.

6.2 Saran

Pemberian probiotik *Bifidobacterium sp* disarankan lebih baik diberikan sebagai upaya pencegahan daripada diberikan sebagai upaya terapi untuk mengurangi kerusakan usus yang diakibatkan oleh depresi.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Azab, Mahmoud. 2017. Anatomy of the Immune System and Lymphatic System. 10.13140/RG.2.2.23234.79042.

Apriliyani, F., N. Suthama, dan H.I. Wahyuni. 2013. Rasio Heterofil Limfosit dan Bobot Relatif Bursa Fabricius Akibat Kombinasi Lama Pencapahan dan Pemberian Porsi Ransum Berbeda pada Ayam Broiler. *Animal Agriculture Journal*, 2(1): 393-399.

Ayuningtyas, D., Misnaniarti, dan M. Rahyani. 2018. Analisis Situasi Kesehatan Mental pada Masyarakat Di Indonesia dan Strategi Penanggulangannya. *Jurnal Ilmu Kesehatan Masyarakat*, 9(1):1-10.

Aziz, A.L. 2011. *Penggunaan Kortikosteroid di Klinik*. Surabaya : Lab. Divisi Gawat Darurat FK Unair.

Carlessi, A.S., L.A. Borba, A.I. Zugno, J. Quevedo, and G.Z. Reus. 2019. Gut Microbiota-Brain Axis in Depression: The Role of Neuroinflammation. *European Journal of Neuroscience*. 53: 222-235.

Caspani, G., S. Kennedy, J.A. Foster, and J. Swann. 2019. Gut Microbial Metabolites in Depression: Understanding the Biochemical Mechanism. *Microbial Cell*. 6(10): 454-481.

Clapp, M., A. Nadia, H. Lindsey, B. Manisha, W. Emily, and W. Sarah. 2017. Gut Microbiota's Effect on Mental Health: The Gut-Brain Axis. *Clinics and Practice*. 7 (987) : 131-136.

Costantine, L. 2014. Gastrointestinal Anatomy and Physiology. *AMN Healthcare Education Services*.

De Punder, K. And L. Pruimboom. 2015. Stress Induces Endotoxemia and Low-Grade Inflammation by Increasing Barrier Permeability. *Frontiers in Immunology*. 6(223): 1-12.

Dharmayanti, A.W.S. 2012. Pengaruh Stres Renjatan Listrik pada Kadar Kolesterol Total pada Serum Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar. *Jurnal Kedokteran Gigi Unej*. 9(1): 54-57.

Dinarelo, C.A. 2018. Overview of the IL-1 Family In Innate Inflammation and Acquired Immunity. *Immunol Rev*. 281(1): 8-27.

Dionisie, V., G.A. Filip, M.C. Manea, M. Manea, and S. Riga. 2021. The Anti-Inflammatory of SSRI and SNRI in The Treatment of Depression: A Review of Human and Rodent Research Studies. *Inflammopharmacology* 29: 75-90.

eBioscience. 2012. Cytokine Atlas : First Edition.

Fadgyas-Stanculete, M., Ana-Maria B., Popa-Wagner A., and D. Dan L. 2014. The Relationship Between Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Disorder: From Molecular Changes to Clinical Manifestations. *Journal of Molecular Psychiatric*. 2 (4) : 1-7.

Fathiya, S. 2018. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun Zaitun (Olea europaea L.) Terhadap Jumlah Sel Goblet pada Trakea Mencit Galur DDY yang Diinduksi Ovalbumin* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.

Febyan, W. S. Handawati, T. Ayudhea, dan H. Johannes. 2019. Peranan Sitokin pada Keadaan Stres Sebagai Pencetus Depresi. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*. 6 (4) : 210-214.

Fidzaro. 2010. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Klabet (Trigonella foenum-graceum L) Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Gambaran Histologi Pankreas Mencit (Mus musculus) yang Terpapar Streptozotocin* [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Ganesha, I Gde H., dan W. I Made S. 2016. *Probiotik*. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana.

Gorgun B.U. and E. L.Yilmaz. 2020. Short-Chain Fatty Acids Production by *Bifidobacterium Species* in the Presence of Salep. *Electronic Journal of Biotechnology*. 47: 29-35.

Harahap, M. 2011. *Uji Toksisitas Akut Biopigmen Karotenoid Simbion Bakteri dengan Invertebrata Laut (Kajian Terhadap Duodenum Mencit BALB/C)* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.

Hartanto, N.D. 2017. *Gambaran Histopatologi Usus Halus Tikus Wistar Akibat Luka Bakar Termal Seluas 30% Total Body Surface Area (TBSA) pada Fase Intravital, Perimortem dan Postmortem* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro.

Haryanto., H.D.Wahyuningsih, dan S.Nandiroh. 2015. Sistem Deteksi Gangguan Depresi pada Anak-anak dan Remaja. *Jurnal Ilmiah Teknik Industri*, 14(2):142-152.

Harsas, N.A. 2014. *Analisis Kadar Interleukin-1 β untuk Melihat Hubungan Stres Akademik Terhadap Status Penyakit Periodontal pada Peserta Program Profesi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia* [Tesis]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Indonesia.

Hasaaanah, I.F. 2009. *Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (Centella asiatica) Terhadap Spermatogenesis Mencit (Mus musculus)* [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Hasibuan, F.E. dan K.B. Jonathan. 2017. Interaksi Antara Mikrobiota usus dan Sistem Kekebalan Tubuh Manusia. *Jurnal Ilmiah Sains*. 17 (1): 35-42.

Huda, K., L. W. Paramita, Soeharsono, H. Sri, H. Nenny, dan K. Rochmah. 2019. Pengaruh Pemberian Probiotik *Lactobacillus Acidophilus* dan *Bifidobacterium* sp Terhadap Konsumsi Pakan dan Hen Day Production (HDP) Ayam Petelur yang Diinfeksi *Eschericia Coli*. *Jurnal Peternakan Nusantara*. 5(1): 37-42.

Indrayanto, Y. dan D.H. Prasetyo. 2013. Efek Probiotik Terhadap Mortalitas, Derajat Inflamasi Intestinal, dan Kadar IgA pada Mencit Model Sepsis. *Majalah Kedokteran Bandung*. 45(1): 10-15.

Ismiraj, M.R. 2020. Review: Tinjauan Mengenai Bursa Fabricius pada Ayam. *Jurnal Sumber Daya Hewan*, 1(1): 19-26.

Karmini, M., B.Hegar, dan B.A.Pranoto. 2007. Pengaruh Penambahan *Bifidobacterium* dalam Susu terhadap Perkembangan Mikroflora Saluran Cerna Anak Usia 12-24 Bulan. *Sari Pediatri*, 9(2):87-92.

Kim, S.W., H.M. Kim, K.M. Yang, S.A. Kim, S.K. Kim, M.J. An, J.J. Park, S.K. Lee, T.I. Kim, W.H. Kim, and J.H. Cheon. 2010. *Bifidobacterium lactis* Inhibits NF- κ B in Intestinal Epithelial Cells and Prevents Acute Colitis and Colitis-associated Colon Cancer in Mice. *Inflammatory Bowel Disease Journal* 16(9): 1514-1525.

Koo, J.W. and R.S. Duman. 2009. Evidence for IL-1 Receptor Blockade as A Therapeutic Strategy for The Treatment of Depression. *National Institute of Health*. 10(7): 664-671.

Kusumadewy, W. 2012. *Perbandingan Kadar Interleukin-1 β (IL-1 β) dalam Cairan Krevikular Gingiva Anterior Mandibula Pasien pada Tahap Awal Perawatan Ortodonti Menggunakan Braket Self-Ligating Pasif dengan Braket Konvensional Pre-Adjusted MBT* [Tesis]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Indonesia.

Li, J., Z. Wang, J. Cao, Y.L. Dong, and Y.X. Chen. 2014. Role of Monochromatic Light on Development of Cecal Tonsil in Young Broilers. *The Anatomical Record*, 297: 1331-1337.

Lisdiana. 2012. Regulasi Kortisol pada Kondisi Stres dan Addiction. *Biosantifika*, 4(1):18-26.

Lukman, A. 2008. Mekanisme dan Regulasi Hormon Glukokortikoid pada Manusia. *Biospecies*. 1(1): 25-28.

Manin, F., H. Ella, dan Yusrizal. 2012. Potensi Bakteri *Bacillus* dan *Lactobacillus* sebagai Probiotik Untuk Mengurangi Pencemaran Amonia pada Kandang Unggas. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 14 (2): 360-367.

Mescher, A. L. 2013. *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas*. Edisi 13. Mc Graw Hill Education. 309-316.

Miller, J. F. 2002. The Discovery of Thymus Function and of Thymus-Derived Lymphocytes. *Immunol Rev.* 185 (1): 7-14.

Mudyandzo, T.A., H. Chandanbindya, Y. Oksana, A. Nalini Narayanan, and A. Hasan M. 2018. Irritable Bowel Syndrome and Depression: A Shared Patogenesis. *Cureus* 10(8):e3178. DOI 10.7759/cureus.3178

Ningtyas, A.R., I.M.Puspitasari, R.K.Sinuraya. 2018. Review Artikel : Farmakoterapi Depresi dan Pengaruh Jenis Kelamin Terhadap Efikasi Antidepresan. *Farmaka*, 16(2):186-201.

O'mahony, S.M., M. Julian R., S. Paul, C. Caroline, Anne-Marie C., Q. Eamonn M., C. John F., and D. Timothy G. 2009. Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses. *BIOL PSYCHIATRY*. 65 : 263-267

Oligschlaeger, Y., Y. Tulasi, H. Tom, O. Claudia Maria, and S. Ronit. 2019. Inflammatory Bowel Disease: A Stressed "Gut/Feeling". *Cells*. 8 (659) : 1-26.

Oxford Biomedical Research. 2008. Enzyme Immunoassay for Corticosterone. Oxford Biomedical Research Inc. Page : 1-5

Picard, C., J. Fioramonti, A. Francois, T. Robinson, F. Neant, and C. Matuchansky. 2015. Review Article: Bifidobacteria as Probiotic agents – Physiological effects and Clinical Benefits. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 22: 495-512.

Pizem, J. And A. Cor. 2003. Detection of Apoptotic Cells in Tumour Paraffin Sections. *Radiol Oncol* 37(4): 225-232.

Ren, K. And R. Torres. 2009. Role of Interleukin-1 β During Pain and Inflammation. *National Institute of Health*. 60(1): 57-64.

Rostika, N. 2012. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Minyak Jintan Hitam (Nigella sativa) Terhadap Gambaran Histologi Organ Lambung dan Usus Halus Mencit (Mus musculus)* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.

Rosyanti, L. Dan H. Indriono. 2018. *E-Book, Memahami Gangguan Depresi Mayor (Mayor Depressive Disorder) : Pendekatan Psikoneuroimunologi ; Kajian Sitokin, Tryptophan dan HPA-Aksis*. Kendari. 1-70

Sari, A.V., R.Z.Oktarlina., dan T.Septa. 2017. Masalah Kesehatan Jiwa pada Mahasiswa Kedokteran. *Medula*, 7(4):82-87.

Siagian, Y.A. 2016. *Gambaran Histologis dan Tinggi Vili Usus Halus Bagian Ileum Ayam Ras Pedaging yang Diberi Tepung Daun Kelor (Moringa oleifera) Dalam Ransum* [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Universitas Hasanuddin.

Soini, Y., P. Paakko, and V-P. Lehto. 1998. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *American Journal of Pathology* 153(4): 1041-1053.

Sugiyanto. 2011. *Selamat Hari Kesehatan Mental Se-Dunia. Bimbingan dan Konseling Fakultas Ilmu Pendidikan*. Universitas Negeri Yogyakarta.

Sunaryanto, R., M. Efrida, dan M. Bambang. 2014. Uji Kemampuan *Lactobacillus casei* Sebagai Agensi Probiotik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 1(1): 9-14.

Swacita, I.B.N. 2017. *Bahan Ajar MK. Kesmavet II (Higiene Makanan): Pemeriksaan Kesehatan Ante-Mortem dan Post-Mortem*. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

Tasmil, A.M. 2012. *Gambaran Tingkat Sindrom Depresi pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Semester Ganjil Tahun Akademik 2012/2013* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatera Utara.

Udumoh, A.F., I.C. Nwaogu, U.M. Igwebuike, and I.R. Obidike. 2021. Morphological Assesment of the Cecal Tonsil of Pre-hatch and Post-hatch Broiler Chicken. *Acta Vet Eurasia*, 47: 29-36.

Wahyuni, A. A. S. 2018. *Diagnosis dan Patofisiologi Gangguan Depresi Mayor*. Program Pendidikan Dokter Spesialis-I. Departemen Psikiatri FK UNUD / RSUP SANGLAH Denpasar.

Widyaningsih, E.N. 2011. Peran Probiotik Untuk Kesehatan. *Jurnal Kesehatan*. 4(1) : 14-20.

Yakoob, R. And B.V. Pradeep. 2019. Bifidobacterium sp as Probiotic Agent – Roles and Applications. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 13(3): 1407-1417.

Yamaguchi, T., L. Joo-ho, L. A-Rang, S. Joon-Soo, Y. Eun-Ji, and O. Tae-Jin. 2018. Bioconversion of Corticosterone into Corticosterone-Glucoside by Glucosyltransferase. *Molecules*. 23 (1783) : 1-12.

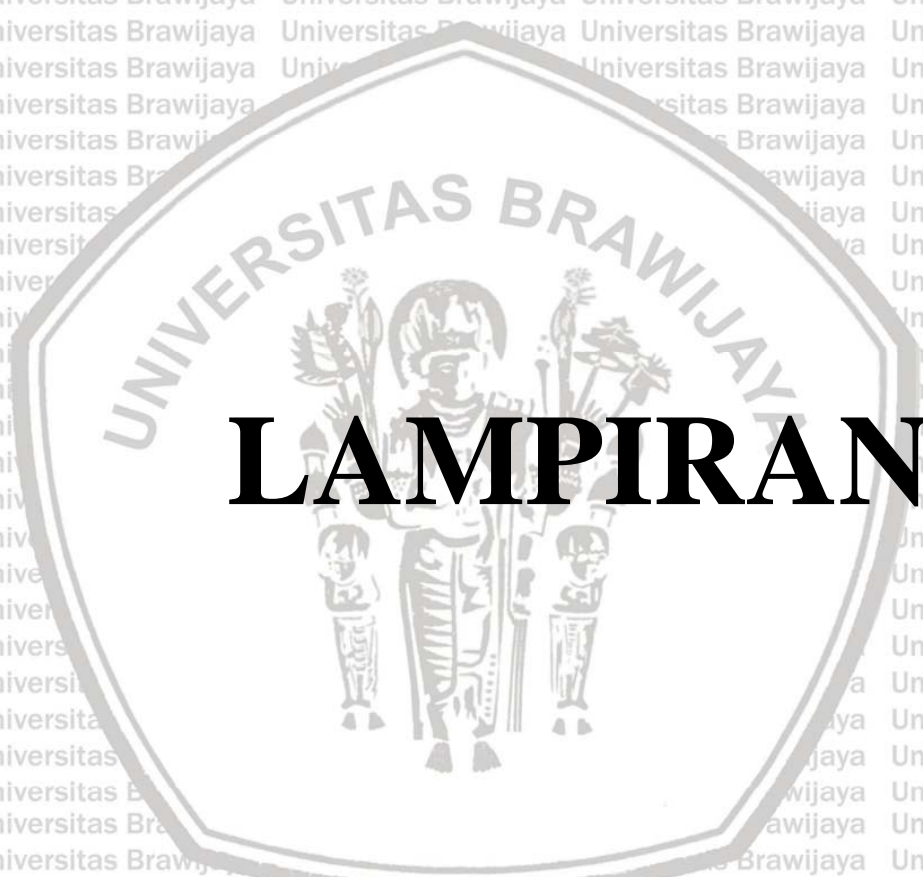
Yamazaki, T., K. Kyoko, and E. Osamu. 2012. The ddY Mouse: A Model of Postprandial Hypertriglyceridemia in response to Dietary Fat. *Journal of Lipid Research*. 53: 2024-2037.

Yulianto, W. dan Y.B.H. Sakti. 2017. Vitamin E dan Omega-3 Topikal Intraperitoneum Mencegah Adhesi Intraperitoneum Melalui Inhibisi Kadar Interleukin-1 β (IL- β) Cairan Peritoneum. *SAINTEKS*, 14(2):133-142.

Zhang, J.M. and J. An. 2007. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthetical Clin.* 45(2): 27-37.

Zhao, Y., R. Ma, J. Shen, H. Su, D. Xing, and L. Du. 2008. A Mouse Model of Depression Induced by Repeated Corticosterone Injections. *European Journal of Pharmacology*, 581: 113-120.

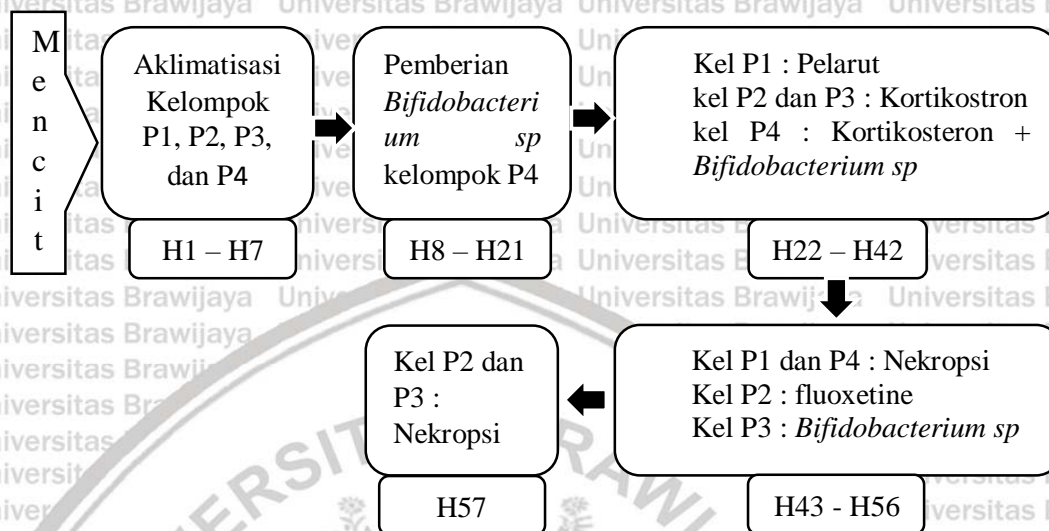




LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

A. Rancangan Perlakuan

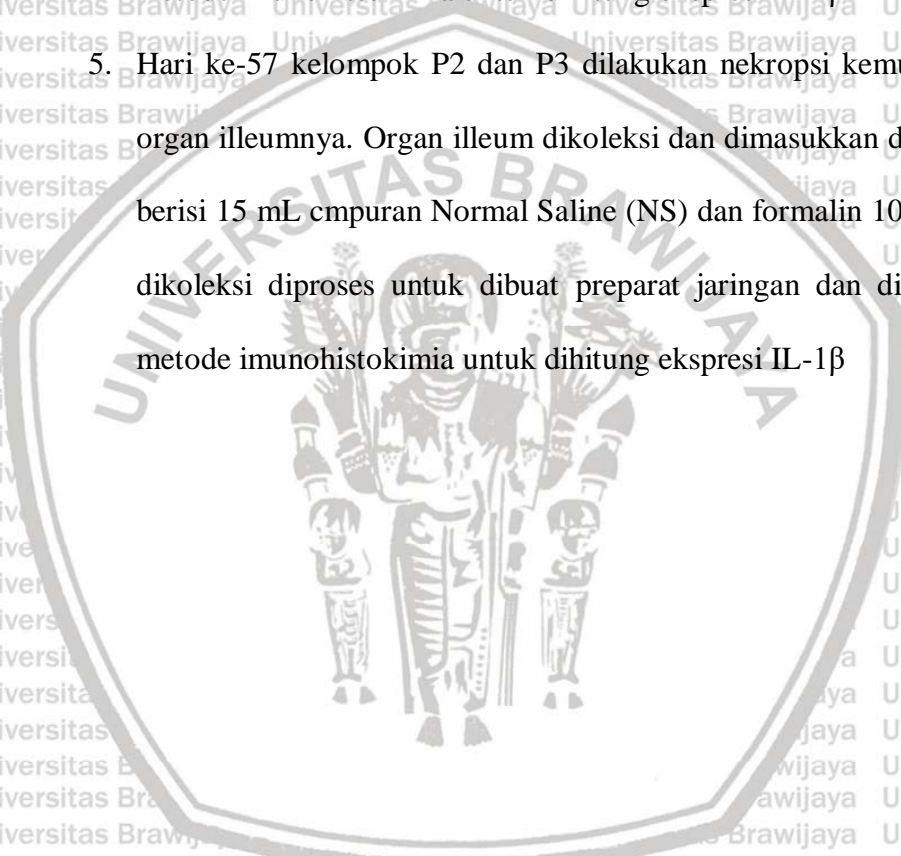


Keterangan :

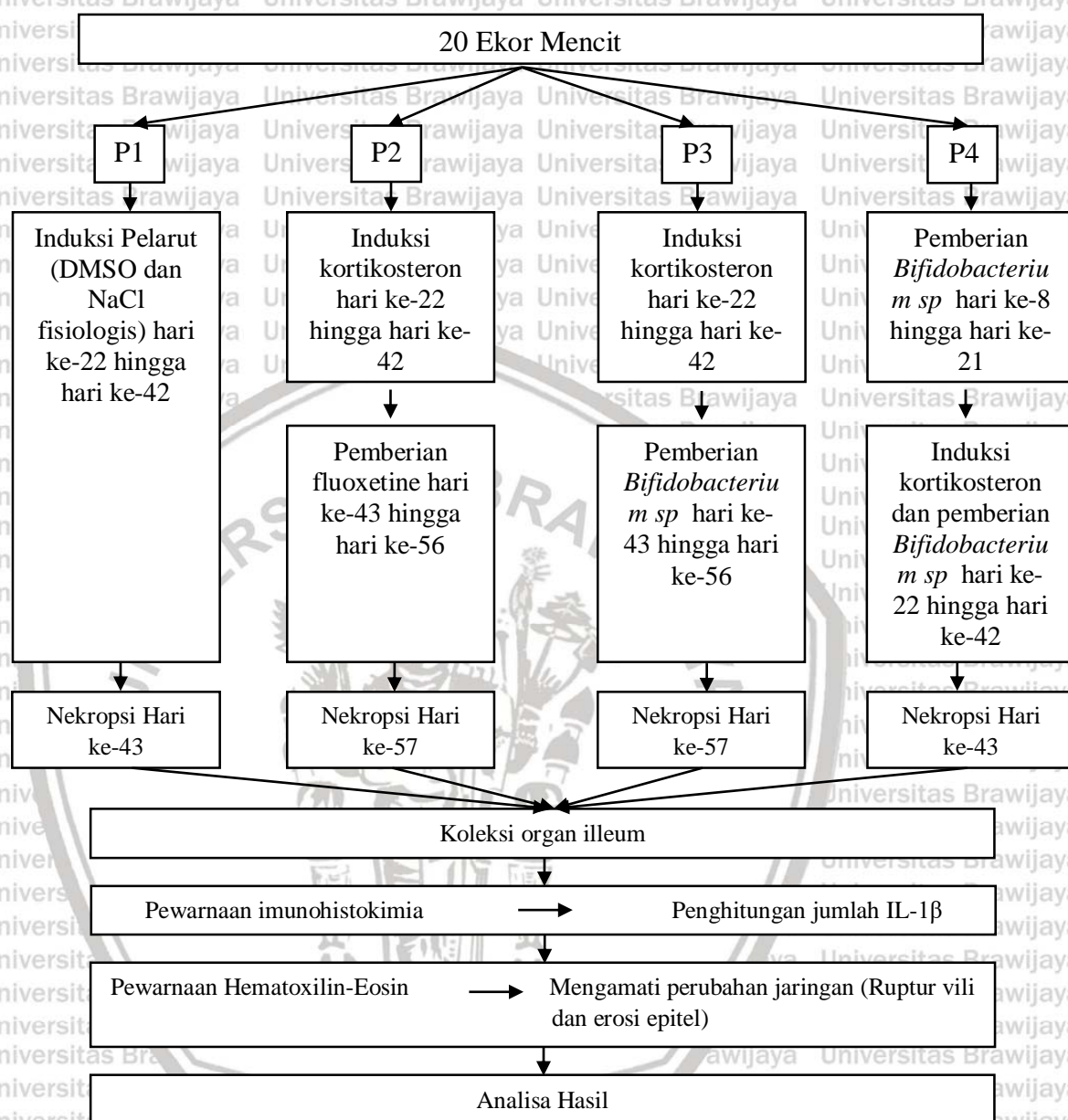
1. Mencit untuk semua perlakuan diaklimatisasi selama 7 hari dengan diberikam pakan standar dan minum *ad libitum* untuk menyesuaikan kondisi tubuh dengan lingkungan barunya
2. Hari ke-8 sampai hari ke-21, kelompok P4 diberi probiotik *Bifidobacterium* sp sebagai tindakan preventif
3. Hari ke-22 sampai hari ke-42, kelompok P1 mulai diberi pelarut, sedangkan kelompok P2 dan P3 diinduksi kortikosteron, dan untuk kelompok P4 mulai diinduksi kortikosteron tetapi pemberian probiotik *Bifidobacterium* sp tetap diberikan seperti sebelumnya dan pemberian probiotik *Bifidobacterium* sp diberikan sesudah induksi kortikosteron.
4. Hari ke-43 hingga hari ke-56 untuk kelompok P2 diberikan fluoxetine sebagai tindakan terapi menggunakan obat standar, kelompok P3 diberikan

probiotik *Bifidobacterium sp* sebagai tindakan terapi, dan untuk kelompok P1 dan P4 pada hari ke-43 dilakukan nekropsi kemudian dikoleksi organ ileumnya. Organ ileum dikoleksi dan dimasukkan dalam pot organ berisi 15 mL campuran Normal Saline (NS) dan formalin 10%. Organ yang dikoleksi diproses untuk dibuat preparat jaringan dan dianalisa dengan metode imunohistokimia untuk dihitung ekspresi IL-1 β .

5. Hari ke-57 kelompok P2 dan P3 dilakukan nekropsi kemudian dikoleksi organ ileumnya. Organ ileum dikoleksi dan dimasukkan dalam pot organ berisi 15 mL campuran Normal Saline (NS) dan formalin 10%. Organ yang dikoleksi diproses untuk dibuat preparat jaringan dan dianalisa dengan metode imunohistokimia untuk dihitung ekspresi IL-1 β



B. Kerangka Operasional



Lampiran 2. Penghitungan Dosis Pemberian Kortikosteroid dan Bifidobacterium sp per-ekor mencit.

I. Probiotik *Bifidobacterium sp*

Dosis probiotik = 30 mg/kgBB

Berat badan = 35 gram

= 0,035 kg

Volume obat = Dosis x Berat badan
= 30 mg/KgBB x 0,035 kg
= 1,05 mg

Jumlah pelarut untuk volume obat = 0,5 mL NaCl fisiologis 0,9%

II. Kortikosteron

Dosis Kortikosteron = 20 mg/kgBB

Berat badan = 35 gram

= 0,035 kg

Volume obat Kortikosteron = Dosis x Berat badan
= 20 mg/KgBB x 0,035 kg
= 0,7 mg

Jumlah NaCl = Dosis NaCl x Volume kortikosteron
= 5 mL/kg x 0,7 mg
= 0,35 mL

Jumlah tween 80 = 0,1% x 0,35 mL
= 0,00035

Jumlah DMSO = 0,1% x 0,35 mL
= 0,00035

Lampiran 3. Proses Pembuatan Preparat Histopatologi

1. Pengambilan Sampel, Fiksasi, dan Pemotongan Organ

Pengambilan sampel organ ileum dilakukan setelah dilakukan nekropsis, kemudian organ yang diambil dicuci menggunakan NaCl fisiologis 0,9% untuk menghilangkan darah. Sampel organ dibuat dalam ukuran 1cm^3 untuk evaluasi histopatologi dan fiksasi dengan paraformaldehid 4%.

2. Dehidrasi dan Infiltrasi

Dehidrasi dilakukan dengan memasukkan organ ke dalam alkohol bertingkat secara berurutan. Pertama dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95% kemudian dimasukkan kedalam alkohol absolut I, alkohol absolut II, dan alkohol absolut III. Masing-masing dilakukan perendaman selama 1 jam pada setiap tingkatannya.

3. Penjernihan

Proses selanjutnya yaitu penjernihan dengan memindahkan sampel yang telah direndam ke dalam alkohol absolut III ke dalam larutan xylol. Penjernihan menggunakan lautan xylol dilakukan secara berulang yaitu pada larutan xylol I, xylol II, dan xylol III. Untuk larutan xylol I dan xylol II dilakukan perendaman selama 1 jam dan untuk larutan xylol III dilakukan perendaman selama 30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada suhu inkubator.

4. Infiltrasi Parafin

Setelah selesai dilakukan penjernihan menggunakan larutan xylol III, preparat jaringan dimasukkan ke dalam paraffin cair selama 1 jam di dalam oven

5. Perendaman dan Pencetakan

Paraffin dimasukkan ke cetakan sampai setengah, kemudian potongan jaringan dimasukkan dan cetakan ditambah dengan paraffin sampai penuh.

Proses pencetakan ini menggunakan tissue embedding console. Setelah itu dilakukan pembekuan parafin dengan cara didinginkan hingga memadat sebelum dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom.

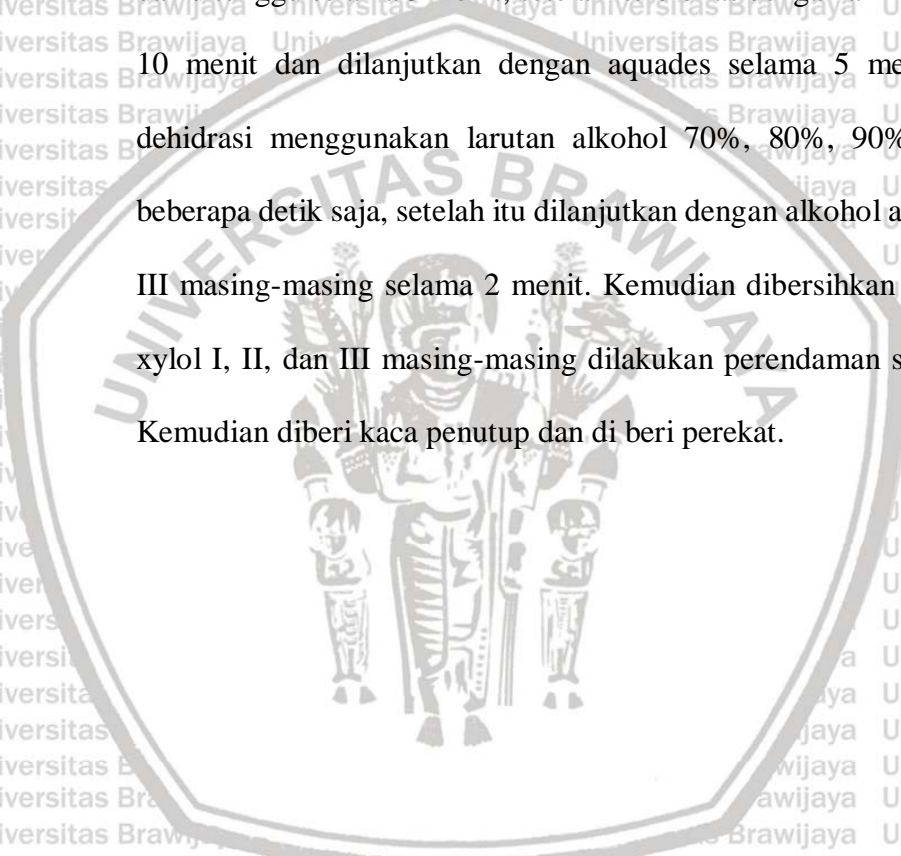
6. Pemotongan

Pemotongan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan sekitar 4-5 μ m. Pada saat dilakukan pemotongan, diletakkan baskom berisi air dingin dibawah mikrotom untuk menampung hasil potongan. Hasil potongan yang akan digunakan kemudian ditempelkan pada gelas objek menggunakan pinset. Setelah itu, dikeringkan pada suhu ruang. Sediaan disimpan di dalam inkubator hingga dilakukan pewarnaan.

7. Pewarnaan

Sediaan yang akan dilakukan pewarnaan sebelumnya harus dilakukan deparafinisasi menggunakan xylol. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol absolut I, alkohol absolut II, dan alkohol absolut III, alkohol 95%, alkohol 90%, alkohol 80%, dan alkohol 70% yang mana setiap perendaman dilakukan selama 3 menit. Setelah dilakukan rehidrasi,

maka preparat dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan dilanjutkan dengan menggunakan aquades selama 5 menit. Sediaan kemudian diberi pewarna Hematoksilin dan dibiarkan selama 1 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir selama 10 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Kemudian dilanjutkan dengan pemberian pewarna eosin dan ditunggu selama 5 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir selama 10 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Dilakukan dehidrasi menggunakan larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95% selama beberapa detik saja, setelah itu dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, dan III masing-masing selama 2 menit. Kemudian dibersihkan dengan larutan xylol I, II, dan III masing-masing dilakukan perendaman selama 3 menit. Kemudian diberi kaca penutup dan di beri perekat.



Lampiran 4. Surat Keterangan Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 1194-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA

TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH PEMBERIAN PROBIOTIK (*Bifidobacterium*
sp) TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI ORGAN DUODENUM PADA MENCIT
(*Mus musculus*) MODEL DEPRESI YANG DIINDUKSI
KORTIKOSTERON

PENELITI : AGATHIS WIKU GHASANANDA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK



Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 5. Hasil Statistika Preparat Histopatologi

Tests of Normality							
	Kelompok Penelitian	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hasil Penelitian	Kelompok 1	,223	5	,200*	,924	5	,554
	Kelompok 2	,300	5	,161	,776	5	,050
	Kelompok 3	,291	5	,191	,905	5	,440
	Kelompok 4	,254	5	,200*	,914	5	,492

* This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
Kelompok 1		5	,5700	,34569	,15460	,1408	,9992
Kelompok 2		5	,8000	,58310	,26077	,0760	1,5240
Kelompok 3		5	1,0000	,40000	,17889	,5033	1,4967
Kelompok 4		5	,9200	,30332	,13565	,5434	1,2966
Total		20	,8225	,42130	,09421	,6253	1,0197
Model	Fixed Effects			,42175	,09431	,6226	1,0224
	Random Effects				,09431 ^a	,5224 ^a	1,1226 ^a

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil Penelitian	Based on Mean	,492	3	16	,693
	Based on Median	,200	3	16	,895
	Based on Median and with adjusted df	,200	3	10,694	,894
	Based on trimmed mean	,440	3	16	,727

ANOVA

Hasil Penelitian					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,526	3	,175	,986	,424
Within Groups	2,846	16	,178		
Total	3,372	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable:

Tukey HSD

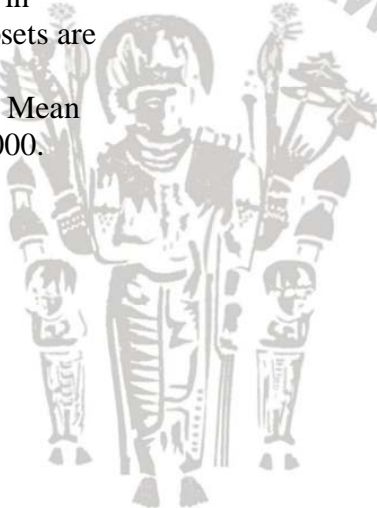
(I) Kelompok Penelitian		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok 1	Kelompok 2	-.023000	0,26674	0,824	-0,9931	0,5331
	Kelompok 3	-.043000	0,26674	0,400	-1,1931	0,3331
	Kelompok 4	-.035000	0,26674	0,569	-1,1131	0,4131
Kelompok 2	Kelompok 1	0,23000	0,26674	0,824	-0,5331	0,9931
	Kelompok 3	-0,20000	0,26674	0,875	-0,9631	0,5631
	Kelompok 4	-0,12000	0,26674	0,969	-0,8831	0,6431
Kelompok 3	Kelompok 1	0,43000	0,26674	0,400	-0,3331	1,1931
	Kelompok 2	0,20000	0,26674	0,875	-0,5631	0,9631
	Kelompok 4	0,08000	0,26674	0,990	-0,6831	0,8431
Kelompok 4	Kelompok 1	-0,35000	0,26674	0,569	-0,4131	-1,1131
	Kelompok 2	0,12000	0,26674	0,969	-0,6431	0,8831
	Kelompok 3	-0,08000	0,26674	0,990	-0,8431	0,6831

Hasil Penelitian

Tukey HSD ^a		
Kelompok Penelitian	N	Subset for alpha = 0.05
Kelompok 1	5	0,5700
Kelompok 2	5	0,8000
Kelompok 4	5	0,9200
Kelompok 3	5	1,0000
Sig.		0,400

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.



Lampiran 6 Hasil Statistika Immunohistokimia

Tests of Normality							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Penelitian	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hasil Penelitian	Kelompok 1	,308	5	,137	,835	5	,152
	Kelompok 2	,303	5	,149	,838	5	,159
	Kelompok 3	,221	5	,200*	,904	5	,435
	Kelompok 4	,178	5	,200*	,931	5	,601

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok 1	5	11,2680	3,63171	1,62415	6,7586	15,7774
Kelompok 2	5	13,7600	4,80989	2,15105	7,7877	19,7323
Kelompok 3	5	12,3080	2,94070	1,31512	8,6566	15,9594
Kelompok 4	5	8,8280	2,61934	1,17140	5,5757	12,0803
Total	20	11,5410	3,78409	,84615	9,7700	13,3120

ANOVA					
Hasil Penelitian					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	64,736	3	21,579	1,665	,214
Within Groups	207,332	16	12,958		
Total	272,068	19			

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil Penelitian	Based on Mean	,291	3	16	,831
	Based on Median	,204	3	16	,892
	Based on Median and with adjusted df	,204	3	11,274	,892
	Based on trimmed mean	,257	3	16	,855

Dependent Variable:

Tukey HSD

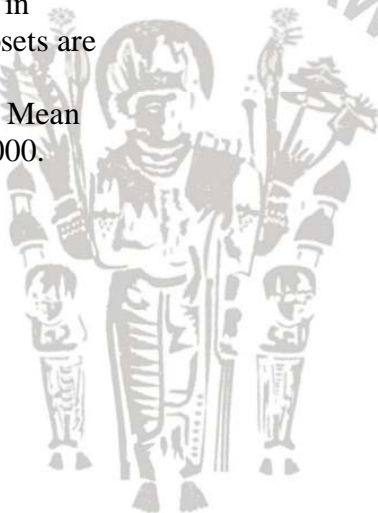
(I) Kelompok Penelitian		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok 1	Kelompok 2	-2,49200	2,27669	0,698	-9,0056	4,0216
	Kelompok 3	-1,04000	2,27669	0,967	-7,5536	5,4736
	Kelompok 4	2,44000	2,27669	0,711	-4,0736	8,9536
Kelompok 2	Kelompok 1	2,49200	2,27669	0,698	-4,0216	9,0056
	Kelompok 3	1,45200	2,27669	0,918	-5,0616	7,9656
	Kelompok 4	4,93200	2,27669	0,175	-1,5816	11,4456
Kelompok 3	Kelompok 1	1,04000	2,27669	0,967	-5,4736	7,5536
	Kelompok 2	-1,45200	2,27669	0,918	-7,9656	5,0616
	Kelompok 4	3,48000	2,27669	0,445	-3,0336	9,9936
Kelompok 4	Kelompok 1	-2,44000	2,27669	0,711	-8,9536	4,0736
	Kelompok 2	-4,93200	2,27669	0,175	-11,445	1,5816
	Kelompok 3	-3,48000	2,27669	0,445	-9,9936	3,0336

Hasil Penleitian

Tukey HSD ^a		
Kelompok Penelitian	N	Subset for alpha = 0.05
Kelompok 4	5	8,8280
Kelompok 1	5	11,2680
Kelompok 3	5	12,3080
Kelompok 2	5	13,7600
Sig.		0,175



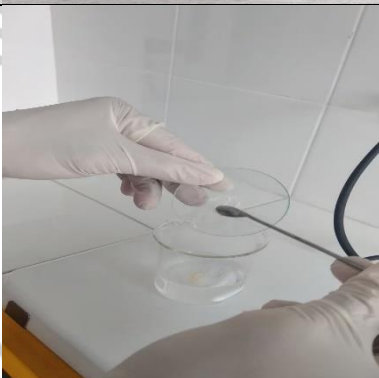
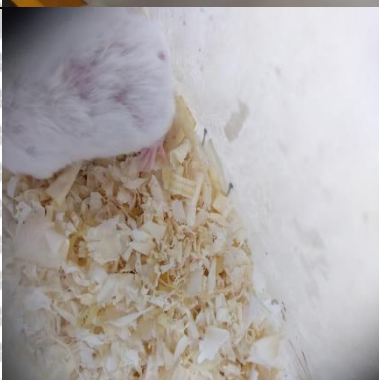
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

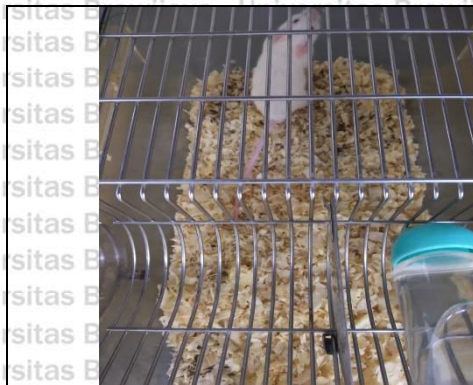
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.



Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian

Gambar/Foto	Keterangan
	Kortikosteron yang digunakan dalam penelitian
	Probiotik <i>Bifidobacterium sp</i> yang digunakan dalam penelitian ini
	Usus mencit setelah dipisahkan dari lambung
	Organ pencernaan mencit yang telah dipisahkan duodenum, jejunum, dan illeum kemudian dimasukkan ke dalam formalin 10%

	<p>Proses nekropsi mencit</p>
	<p>Larutan probiotik <i>Bifidobacterium</i> sp</p>
	<p>Proses pelarutan probiotik <i>Bifidobacterium</i> sp</p>
	<p>Kerontokan rambut pada mencit yang mengalami depresi</p>



Tidak terjadi kerontokan rambut
pada mencit yang tidak mengalami
depresi



Proses pemberian probiotik
Bifidobacterium sp secara per-oral

Lampiran 8 Hasil Pengamatan Skor Integritas Epitel Mukosa Ileum Berdasarkan Modifikasi Kriteria Barthel Manja.

Kelompok Penelitian	Mencit	Skor Setiap Lapang Pandang					Rata-rata
		I	II	III	IV	V	
Kelompok 1	1	1	0	0	0	0	0,2
	2	2	1	0	0	0	0,25
	3	0	1	1	2	1	1
	4	1	0	1	0	2	0,8
	5	0	0	2	0	1	0,6
Kelompok 2	1	1	2	1	3	2	1,8
	2	0	1	1	1	0	0,6
	3	0	1	0	1	0	0,4
	4	0	1	0	0	1	0,4
	5	1	0	0	0	3	0,8
Kelompok 3	1	0	0	1	1	2	0,8
	2	0	1	0	1	1	0,6
	3	1	0	2	2	3	1,6
	4	0	0	0	1	3	0,8
	5	0	3	0	1	2	1,2
Kelompok 4	1	0	3	0	2	0	1
	2	1	0	1	1	1	0,8
	3	0	0	1	1	1	0,6
	4	0	1	0	2	1	0,8
	5	1	3	0	2	1	1,4